

**TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG
EINER ORALEN VACCINATION
GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

Georg Urbach

1980
—

Aus dem Institut für CHIRURGISCHE FORSCHUNG
(Direktor Professor Dr. Dr. h.c. W. BRENDEL)
der CHIRURGISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK München
im Klinikum Großhadern der Universität München

TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG EINER ORALEN
VACCINATION GEGEN PSEUDOMONAS AERUGINOSA

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Georg Urbach

aus

Augsburg

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Seifert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 1980



Aus der vorliegenden Arbeit wurden folgende Teilaspekte schon publiziert:

LOB, G., v. THIEL, D. & URBACH, G.

Untersuchungen über eine aktive Vaccination gegen *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstraktband der 19. Tagung der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgie, Kremsmünster 1978

SEIFERT, J., URBACH, G. & LOB, G.

Wirksamkeit einer oral applizierten Bakterienvaccine zur Infektionsprophylaxe.

Langenbecks Arch. Suppl. Band Chir. Forum 1980
im Druck.

INHALTSVERZEICHNIS

A) EINLEITUNG

B) MATERIAL UND METHODEN

- 1.1. Ps. aeruginosa-Keim
- 1.2. Keimgewinnung
- 1.3. Typisierung des Ps. aeruginosa-Keimes
- 1.4. Keimzählung
- 1.5. Geräte und Materialien
- 1.6. Herstellung der Impfstoffe
 - 1.6.1. Vaccine V₁
 - 1.6.2. Vaccine V₂
 - 1.6.3. Vaccine V₃
 - 1.6.4. Vaccine V₄
- 2.1. Versuchstiere
- 2.2. Versuchsgruppen
 - 2.2.1. Versuchsgruppe G₁
 - 2.2.2. Versuchsgruppe G₂
 - 2.2.3. Versuchsgruppe G₃
 - 2.2.4. Versuchsgruppe G₄
 - 2.2.5. Versuchsgruppe G₅
 - 2.2.6. Versuchsgruppe G₆
 - 2.2.7. Versuchsgruppe G₇
- 2.3. Orale und parenterale Impfstoffapplikation

- 3.1. Kontrollinfektion
- 3.2. Bakterienagglutination
- 3.3. Immunpräzipitation nach MANCINI
 - 3.3.1. Herstellung der Agaroseplatten
 - 3.3.2. Immundiffusion
 - 3.3.3. Materialien zur Plattenherstellung
- 4. Angaben zur Auswertung der Ergebnisse und zu den statistischen Berechnungen
 - 4.1. Berechnung des Wirkungsindizes
 - 4.2. Berechnung der Mittelwerte
 - 4.3. T-Test

C) DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE IN DREI KAPITELN

- 1. Ergebnisse der Letalität der Versuchstiere nach intraperitonealer Infektion
- 2. Ergebnisse der Bakterienagglutination
- 3. Ergebnisse der Bestimmung der Gamma-globuline, der Immunglobulinfraktionen IgG, IgM sowie der Komplementfraktion C₃

D) DISKUSSION

- 1. Problem der Ps. aeruginosa-Infektionen
- 2. Impfstoff
- 3. Vaccine und ihre enterale Applikation
- 4. Anmerkungen zur Antigendosierung

- 5. Anmerkungen zu möglichen Impfstoff-
nebenwirkungen
- 6. Beurteilung der Vaccineergebnisse
 - 6.1. Kontrollinfektion
 - 6.2. Beurteilung der Ergebnisse der direkten
Bakterienagglutination
 - 6.3. Beurteilung der Ergebnisse der Immun-
diffusion
 - 6.3.1. Gesamtgamma globuline
 - 6.3.2. IgG- und IgM-Immunglobulinfraktionen
und zusätzliche Aspekte zu IgA
 - 6.3.3. Betrachtungen zum Komplementfaktor C_3

E) ZUSAMMENFASSUNG

A) EINLEITUNG

Infektionen, die durch gramnegative Erreger verursacht werden, stellen auch heute immer wieder ein therapeutisches Problem dar. Mit zunehmender Häufigkeit wurde in den letzten Jahren dabei *Ps. aeruginosa* als krankheitsverursachender Keim beobachtet.

Aufgrund seiner anspruchslosigkeit im Wachstumsverhalten und bei der Vermehrung, wie auch seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedener gebräuchlicher Desinfektionsmittel und vieler routinemäßig verwendeter Antibiotika, kann *Ps. aeruginosa* immer häufiger als Problemkeim, insbesondere nosocomialer Infektionen, isoliert werden. Die Häufigkeit von *Ps. aeruginosa* bei nosocomialen Infektionen wird von BENNET (22) mit sieben Erkrankungen pro eintausend hospitalisierter Patienten angegeben. Dies entspricht nach Angaben desselben Untersuchers etwa 10 % aller nosocomialer Infektionen.

Bei Patienten mit nicht vorgeschädigtem Organismus führt *Ps. aeruginosa*, als fakultativ pathogener Keim, trotz Kontamination nur relativ selten zur manifesten Infektion. JAWETZ et al (71) beschreiben deswegen *Ps. aeruginosa* als einen Opportunisten, "der nur dann

pathogen ist, wenn er an Orte gelangt, an denen die normalen Abwehrmechanismen nicht intakt sind oder wenn er an Mischinfektionen beteiligt ist".

Manifeste *Ps. aeruginosa*-Infektionen finden sich vorwiegend bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand oder bei Patienten, die unter einer Störung der Immunabwehr leiden, wobei es sich dabei sowohl um eine Störung der systemischen, wie auch der lokalen Abwehr handeln kann.

Die Möglichkeiten einer konservativen Therapie sind je nach Ausmaß und Lokalisation der Infektion sehr begrenzt. Von großer Bedeutung ist hierbei die primäre Resistenz des Keimes gegenüber vielen routinemäßig angewendeten Antibiotika. Durch ungezielte Antibiotikatherapie, ohne vorausgehende Kultur und Testung, kann durch Suppression empfindlicher Keime und Selektion von *Ps. aeruginosa*, ein ungehindertes Wachstum dieses Keimes innerhalb eines Infektionsherdes u. U. erst ermöglicht werden. Andererseits führen oftmals selbst testgerecht ausgewählte Antibiotika nicht zum gewünschten Erfolg, da je nach Infektionsherd, z. B. in Abszeßhöhlen, in Sequestern oder Totenladen ein therapeutisch wirksamer Mindestspiegel nicht erreicht werden kann.

ADAM und MARGET (2) sehen die Schlüsselstellung zwischen Erreger und Antibiotikum im Organismus selbst. Dieser schaltet sich bei jeder Infektion mit seinen eigenen Abwehrkräften in das Krankheitsgeschehen ein. Deswegen ist eine therapeutische Beeinflussung des Immunsystems sicherlich erfolgversprechend und gerechtfertigt.

Zahlreiche Veröffentlichungen der vergangenen Jahre berichten über eine erfolgversprechende Anwendung von Impfstoffen gegen *Ps. aeruginosa*-Infektionen (7; 88; 105; 106). Insbesondere bei schweren Verbrennungen konnte die Infektionsrate von *Ps. aeruginosa*-Infektionen nach parenteraler Vaccination mit *Ps. aeruginosa*-Impfstoffen aus hitzeinaktivierter polyvalenter Ganzkörper-vaccine sowie aus löslichen *Pseudomonas*-antigenfraktionen erheblich gesenkt werden (3; 4; 5; 44; 45; 72; 73; 74; 78; 93).

Auch bei anderen bakteriell bedingten Infektionen, z. B. bei der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis ist eine parenterale Vaccinetherapie z. B. mit abgetöteten Bakterien nicht neu. Bereits 1921 finden sich hierzu in der französischen Literatur Hinweise von DELREZ und GRÉGOIRE (39) über gute Ergebnisse nach parenteraler Vaccineanwendung. 1933 berichtet GROSS (56)

Über eine erfolgreiche Vaccinetherapie bei Osteomyelitis. Weitere erfolgversprechende Veröffentlichungen von PHILIPOWICZ (99), AUSTIN und JOYNER (12), BAKER und SHANDS (14) und einige weitere folgten. Erwähnenswert ist ebenfalls noch die SCHICK-Vaccine (110).

(SCHICK-VACCINE: Polyvalente Standardvaccine, die, nach Selektion der pathogenen Keime, aus den Eitererregern mehrerer, an chronischer posttraumatischer Osteomyelitis erkrankter Patienten hergestellt wurde.)

Seit 1968 wird von LIECHTI und WEBER (88) eine polyvalente Staphylokokken-Vaccine, das sog. "Staphypan^R", zur präexpositionellen Immunisierung eingesetzt.

(STAPHYPAN^R (Schweizer Seruminstitut): Vaccine aus polyvalenten Staphylokokkenantigenen.)

Auch HIERHOLZER (64) ist der Ansicht, daß nur bei ausreichender körperlicher Abwehrlage die operative und antibiotische Therapie erfolgreich sein können und deshalb die Möglichkeit der Stimulierung der körpereigenen Abwehrkräfte zu therapeutischen Zwecken mehr beachtet und genutzt werden sollte.

Eine günstige Beeinflussung bakterieller Infektionen durch parenterale Vaccination kann bei einer ganzen Anzahl von Erkrankungen, z. B. bei *Ps. aeruginosa*-

Infektionen des Atemtraktes von Mukoviszidosepatienten, bei Osteomyelitis, Furunkulose, Typhus, Pertussis usw. als gesichert betrachtet werden. Daß diese Form einer antibakteriellen Therapie bis heute, abgesehen von einer Immunisierung mit Bakterientoxoiden, nicht zur breiten therapeutischen Anwendung kam, liegt daran, daß in vielen Fällen, vor allem nach mehrmaligen Injektionen des gleichen Antigens, z. T. erhebliche Nebenwirkungen in Kauf genommen werden mußten. Neben lokalen Reaktionen, wie Rötung, Induration, Abszeßbildung und Muskelnekrosen, werden unter anderem systemische Reaktionen in Form von allgemeiner Abgeschlagenheit und Unwohlsein bis hin zu heftigen Fieber- und Kreislaufreaktionen beschrieben.

ALEXANDER and FISHER (5) berichten bei ihren Untersuchungen mit "Pseudogen"^R, daß bei nahezu 90 % der Patienten eine merkbare lokale oder fieberhafte Reaktion über eine gewisse Zeit erkennbar war. (PSEUDOGEN^R (Fa. Parke-Davis, Detroit): Heptavalente lösliche *Ps. aeruginosa*-Vaccine aus "teilweise gereinigten Lipopolysaccaride mit viel Endotoxineffekt" (5).

Andererseits konnten die gleichen Autoren bei ihrer Fünfjahresstudie mit "Pseudogen"^R die Letalität von

Ps. aeruginosa-Infektionen nach Verbrennungen von 14,7 % einer nicht geimpften Kontrollgruppe auf 3,1 % bei optimal vaccinierten Patienten reduzieren.

Beim Vergleich der hervorragenden klinischen Wirksamkeit des Ps. aeruginosa-Impfstoffes mit den relativ häufig auftretenden Nebenwirkungen, die offensichtlich auf die parenterale Injektion zurückzuführen sind, stellt sich die Frage nach anderen Applikationsformen, die mit weniger Nebenwirkungen behaftet sind.

Bereits 1926 berichtet BESREDKA (23) in einer grundlegenden Studie über die Möglichkeiten einer enteralen Immunisierung, bei der Nebenwirkungen, wie bei der parenteralen Vaccination, nicht beobachtet werden konnten. In zahlreichen Publikationen, die größtenteils erst in den letzten 10 Jahren veröffentlicht wurden, wird über gute klinische Erfolge bei ausgezeichneter Verträglichkeit einer enteralen Vaccinetherapie berichtet. Insbesondere die Arbeitsgruppe um Raettig vom Robert-Koch-Institut Berlin konnte in zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen mit *S. typhi murium*-Bakterien (77), *Dyspepsiecoli*-Bakterien (83) und Staphylokokken (111) mittels oraler Vaccination einen hervorragenden Impfschutz gegenüber intraperitonealen Kontrollinfektionen

mit homologen Keimen erzielen. Den entscheidenden Vorteil der oralen Impfung gegenüber parenteralen Impfverfahren sieht RAETTIG (103) in der außerordentlich guten Verträglichkeit. Allergische Reaktionen konnte er, in Übereinstimmung mit anderen Autoren (23; 47; 66; 67; 111), bei der oralen Vaccination nicht beobachten.

In der vorliegenden Arbeit sollte die grundsätzliche Möglichkeit sowie die Wirksamkeit einer oralen Immunisierung gegen *Ps. aeruginosa* in einem Tiermodell untersucht werden. Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen sind als Vorarbeit für eine aktive orale Vaccination bei chronischer posttraumatischer Osteomyelitis zu betrachten.

Da es in einem Tierversuch sehr schwierig ist, eine Knocheninfektion in ihrem Ausmaß sowie eine Besserung oder Verschlechterung zu beurteilen und definitive Kriterien zur Auswertung zu finden, wurde in dieser Studie eine intraperitoneale Infektion als Kontrollinfektion gewählt. Eine intraperitoneale Infektion läßt sich durch entsprechende Wahl der zu applizierenden Keimzahl und Messung der Letalität oder Überlebensrate nach Setzen der Infektion gut beurteilen und auswerten.

Unter dem Aspekt einer zukünftigen oralen Vaccination gegen *Ps. aeruginosa* im humanmedizinischen Bereich wurden deshalb in dieser Arbeit folgende Fragestellungen besonders berücksichtigt:

1. Läßt sich durch orale Vaccination mit unterschiedlich vorbehandelten *Ps. aeruginosa*-Impfstoffen ein wirksamer Impfschutz gegen eine nachfolgende Infektion mit dem homologen Keim erzielen?
2. Kann durch orale Vaccination ein zur parenteralen Immunisierung vergleichbarer Impfschutz erzielt werden und wie groß ist die Wirksamkeit der einzelnen, unterschiedlich vorbehandelten Impfstoffe im Vergleich untereinander?
3. Finden sich nach oraler Vaccination meßbare Veränderungen des humoralen Immunsystems?
4. Wie verhalten sich nach oraler Vaccination die klinischen Ergebnisse im Vergleich zu den labor-technischen?

B) MATERIAL UND METHODEN

1. *Ps. aeruginosa*-Keim, Keimgewinnung bis Vaccineherstellung
2. Versuchstiere und Einteilung der Versuchsgruppen
3. Untersuchungsmethoden, Kontrollinfektion, Bakterienagglutination, radiale Immunpräzipitation
4. Angaben zur Auswertung der Ergebnisse und zu den statistischen Berechnungen

1.1. PS. AERUGINOSA-KEIM

Ps. aeruginosa wird wegen seiner Fähigkeit zur Farbstoffbildung (Pyocyanin bzw. Pyocin und Fluorescin) auch *Pyocyaneus* genannt. Weiterhin bildet der Keim einen süßlich riechenden Aromastoff, der den charakteristischen Geruch des *Ps. aeruginosa*-Eiters verursacht. Bei dem Keim handelt es sich um ein nicht sporenbildendes, gramnegatives Stäbchen mit einer Länge von 1,5 μ m bis 4 μ m und einer Breite von 0,5 μ m bis 1 μ m. Durch 1 - 3 polare Geißeln ist es aktiv sehr beweglich. Bei vielen Stämmen handelt es sich um obligate Aerobier, einige Stämme gedeihen jedoch auch fakultativ anaerob (49). Es handelt sich um einen typischen Naßkeim mit

einer Vermehrungstemperatur zwischen 10°C und 43°C mit einem Wachstumsoptimum bei 37°C. Als Wachstumsmilieu bevorzugt der Keim feuchte Umweltbedingungen, als Nährstoffe dienen verschiedenste Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen (49; 41; 53; 104).

Ps. aeruginosa ist ein fakultativ pathogener Erreger, wobei sowohl Endotoxinen (Lipopolysaccharide der Zellwand und der Schleimschicht), wie auch Exotoxinen (Hämolysine, Proteasen, Kollagenasen Elastasen, Lecithinasen und Lipasen) pathogene Eigenschaften zugesprochen werden (49).

1.2. KEIMGEWINNUNG

Die Isolierung des Keimes erfolgte aus der Fistel eines Patienten mit chronischer posttraumatischer Osteomyelitis. Der Abstrich wurde sofort auf Dexrosebouillon überimpft und zusätzlich auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Beide Präparate wurden 24 Std. bei 37°C bebrütet. Die Gewinnung einer Reinkultur erfolgte durch zweimaliges fraktioniertes Ausspateln von Einzelkolonien nach mikroskopischer Kontrolle der entsprechenden Grampräparate.

Durch gleichzeitiges Anzüchten des Erregers in Thioglycollatebouillon und in Dextrosebouillon konnte fakultativ anaerobes Wachstum der Reinkultur des isolierten Erregers nachgewiesen werden.

Von der gewonnenen Reinkultur wurde ein Abstrich an das Landesuntersuchungsamt für Gesundheitswesen Südbayern übersandt. Von dort konnte durch Anzüchtung auf Differenzierungsmedien die Diagnose *Ps. aeruginosa* gesichert werden.

Beim Anzüchten auf Blutagarplatten zeigten sich schleimige Kolonien mit β -Hämolyse. Nach längerem Stehenlassen bei Zimmertemperatur und Tageslicht ließ sich neben dem charakteristischen süßlich-aromatischen Geruch vorwiegend im Bereich des Hämolysehofes eine grünlich fluoreszierende Pigmentierung nachweisen.

Zur Konservierung wurde der *Ps. aeruginosa*-Keim auf Eiernährböden überimpft, 20 Std. bei 37°C angezüchtet, mit einer sterilen Metallkappe sowie mit Parafilm als Schutz vor Austrocknung verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

1.3. TYPISIERUNG DES PS. AERUGINOSA-KEIMES

Die Typisierung des Keimes wurde in Form einer Sero- sowie einer Pyocintypisierung am "Max v. Pettenkofer-institut für Hygiene und med. Mikrobiologie" der Universität München vorgenommen. Eine Phagentypisierung, die vorwiegend von epidemiologischen Interesse ist, wurde nicht durchgeführt.

Die Pyocintypisierung erfolgte nach der Methode von BAUERNFEIND, PETERMÜLLER und BURROWS (19). Dabei ergab sich ein Ps. aeruginosa-Keim mit dem Pyocintyp 1d. Die Serotypisierung des Keimes, die nach der Methode nach VERDER und EVANS (130) erfolgte, ergab den Serotyp 2.

1.4. KEIMZÄHLUNG

Die quantitative Keimanalyse erfolgte nach einer gängigen Methode, entnommen aus JAWETZ et al (71). Bei dieser sogenannten Lebendkeimzählung werden nur die vermehrungsfähigen Keime erfaßt. Von einer Zehner-Verdünnungsreihe mit absteigender Verdünnung (9ml sterile 0,9%-ige Kochsalzlösung + 1 ml keimhaltiges Medium, gründliches Durchmischen, Weiter-

verdünnung von 1 ml dieser Lösung mit 9 ml 0,9%-iger Kochsalzlösung usw.) wurde jeweils 1 ml auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Anhand der Zahl der gewachsenen Kolonien konnte die ursprüngliche Keimzahl pro Milliliter Wachstumsmedium ermittelt werden. Fanden sich z. B. auf der Platte, die mit 1 ml Verdünnung des Gläschens Nr. 8 beimpft worden war, 50 Kolonien, so lies sich daraus eine Keimzahl von $50 \times 10^8 = 5 \times 10^9$ Keime pro Milliliter Wachstumsmedium errechnen.

1.5. GERÄTE UND MATERIALIEN

Dextrosebouillon: Bacto-Dextrose-broth, Fa. Difco, Hamburg.

Thioglycolatebouillon: Bacto-Thioglycolate-broth, Fa. Difco, Hamburg.

Blutagarplatten: Glucoseagar (Fa. Merck, Darmstadt) wurde entsprechend der Anleitung in Aqua bidest. gelöst, autoklaviert und nach Abkühlung auf 50°C mit defibriniertem Schafsblut im Verhältnis 1:10 versetzt. Der Blutagar wurde in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser gegossen, die bis zum Erstarren des Agars

horizontal gelagert wurden. Vor Gebrauch wurden die Platten 48 Std. bei 37°C bebrütet, um eventuell kontaminierte Platten aussondern zu können.

Eiernährböden: Die Herstellung dieser Nährböden, die zur Konservierung des Keimes dienten, erfolgte nach einer Methode von HALLMANN und BURCKHARDT (58). Mit Seifenwasser gewaschene und nachfolgend in sterilem Aqua bidest. gespülte Hühnereier wurden 5 min. in 70%-igen Äthylalkohol eingelegt. Nach Entnahme und Abdunsten des Alkohols von der Oberfläche wurde die Schale an der stumpfen Seite mit einer sterilen Pinzette eröffnet und der Inhalt in einen Glaskolben (mit Glasperlen) gegeben. Pro Ei wurden 10 ml 0,9%-ige Kochsalzlösung zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch in Reagenzgläschen abgefüllt. Unter einer Schröglage von 45° erfolgte dann die Festigung der Konservierungsnährböden im Wasserbad bei einer Temperatur von 80°. Vor der Beimpfung mit dem zu konservierenden Keim erfolgte eine 24-stündige Bebrütung bei 37°C, um eventuell kontaminierte Nährböden aussondern zu können.

1.6. HERSTELLUNG DER IMPFSTOFFE

Zur Herstellung der einzelnen Impfstoffe wurde der auf Eiernährböden konservierte Keim zunächst in

Reagenzgläschen mit 10 ml Dextrosebouillon über 20 Std. bei 37°C erneut angezüchtet. Davon wurde dann jeweils 1 ml auf mehrere 1000 ml-Flaskolben mit Dextrosebouillon überimpft. In diesen Flaskolben erfolgte die Anzüchtung des Keimes zur Herstellung der *Ps. aeruginosa*-Vaccine.

Für die 6 Versuchsgruppen (außer der Kontrollgruppe) wurden 4 verschiedene Impfstoffe hergestellt:

Vaccine V₁ für die Versuchsgruppe G₁

Vaccine V₂ für die Versuchsgruppen G₂ und G₅

Vaccine V₃ für die Versuchsgruppen G₃ und G₆

Vaccine V₄ für die Versuchsgruppe G₄

1.6.1. VACCINE V₁: LEBENDKEIM IM ANZUCHTMEDIUM

Dieser Impfstoff, der bei der Versuchsgruppe G₁ zur Anwendung kam, wurde wöchentlich zweimal frisch hergestellt. Hierzu wurde der Keim nach Überimpfung in einen 1000 ml-Kolben mit Dextrosebouillon 20 Std. bei 37°C inkubiert und im Kühlschrank bei einer Temperatur zwischen 0°C - 2°C gelagert (insgesamt höchstens 3 Tage lang). Durch eigene Voruntersuchungen konnte festgestellt werden, daß unter diesen Bedingungen eine Keimzahl von 5×10^8 - 1×10^9 /ml An-

zuchtmedium angezüchtet und für die Dauer von 3 Tagen praktisch konstant gehalten werden konnte.

1.6.2. VACCINE V₂: LEBENDKEIME, ZWEIMAL IN 0,9%-IGER KOCHSALZLÖSUNG GEWASCHEN UND IN DER GLEICHEN LÖSUNG SUSPENDIERT

Dieser Impfstoff kam bei den Versuchsgruppen G₂ und G₅ zur Anwendung. Hierzu wurde der Keim in einen 1000 ml-Kolben mit Dextrosebouillon überimpft und 20 Std. bei 37°C angezüchtet. Die Keimsuspension wurde 20 min. lang bei 3000 UpM $\hat{=}$ 1500 g abzentrifugiert. Um die Stoffwechselaktivität und damit die aktive Beweglichkeit herabzusetzen, wurde sowohl das keimhaltige Medium vor dem Zentrifugieren, wie auch der Rotorraum der verwendeten Christ-Zentrifuge auf eine Temperatur von 1°C abgekühlt. Hiermit sollte eine aktive Wanderung vom Sediment in den Überstand nach Beendigung der Zentrifugation vermieden bzw. stark reduziert werden.

Der Überstand wurde vorsichtig mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe unter Zwischenschaltung eines Sammelgefäßes abgesaugt, das Sediment nach zweimaligem Wa-

schen in 0,9%-iger NaCl-Lösung und jeweils nachfolgender Zentrifugation in oben beschriebener Weise in 50 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung resuspendiert.

Nach vorangehender Keimzählung wurde diese Suspension mit 0,9%-iger Kochsalzlösung auf eine Keimzahl von 10^{10} Ps. aeruginosa-Keime pro Milliliter eingestellt und als konzentrierte Stammlösung der Lebendvaccine V_2 im Kühlschrank bei 4°C kurzfristig gelagert.

Von dieser Stammlösung erfolgte täglich, nach gründlichem Durchmischen mittels eines Magnetrührers, die Entnahme der für die tägliche Impfstoffapplikation erforderliche Menge und die Einstellung mit 0,9%-iger NaCl-Lösung auf eine Keimzahl von $10^9/\text{ml}$.

1.6.3. VACCINE V_3 : HITZEINAKTIVIERTE KEIME, ZWEIMAL IN 0,9%-IGER KOCHSALZLÖSUNG GEWASCHEN UND IN DER GLEICHEN LÖSUNG SUSPENDIERT

Dieser Impfstoff kam bei den Versuchsgruppen G_3 und G_6 zur Anwendung. Bis zur Herstellung der eingestellten Stammlösung mit 10^{10} Ps. aeruginosa-Keimen pro Milliliter verlief die Herstellung der Vaccine

V₂ und V₃ in einem Arbeitsgang. 100 Milliliter der auf 10^{10} K/ml eingestellten Stammlösung wurden zur Herstellung der Vaccine V₃ über eine Dauer von 90 Minuten bei einer Temperatur von 64°C im Wasserbad hitzeinaktiviert. Nach einer anschließenden Sterilitätsprüfung (Überimpfung auf Blutagarplatten, Dextrose- und Thioglycolatebouillon und Inkubation über 48 Std. bei 37°C) wurde diese Suspension als Stammlösung der hitzeinaktivierten Vaccine bei 4°C aufbewahrt. Die Herstellung der Gebrauchslösung erfolgte täglich durch Verdünnung der Stammlösung mit 0,9%-iger Kochsalzlösung auf 10^9 K/ml.

1.6.4. VACCINE V₄: KORPUSKELFREIES WACHSTUMSMEDIUM MIT LYSE- UND STOFFWECHSELPRODUKTEN VON PS. AERUGINOSA

Die Herstellung dieses Impfstoffes erfolgte ausgehend von der Vorstellung, daß infolge des Stoffwechsels der Keime sowie aufgrund eines kontinuierlichen Absterbens gealterter Keime, Substanzen (Exo- und Endotoxine) mit antigener Wirksamkeit sich im Nährmedium lösen.

Als potentielle immunogene Substanzen dienten hierbei lösliche Zerfallsprodukte abgestorbener Keime sowie Stoffwechselprodukte bzw. Exotoxine, die nach LIU (86) eine ganze Anzahl verschiedener pathogener Faktoren enthalten, z. B. einen phytotoxischen Faktor, Blausäure, proteolytische Enzyme, Phospholipase, Enterotoxin, Exotoxin und Schleim. Von vielen dieser oder ähnlichen Substanzen, die von weiteren Untersuchern beschrieben wurden (15; 33; 40; 84; 85; 86; 97), sind die genauen chemischen, physikalischen, pathophysiologischen, antigenen und immunogenen Eigenschaften noch nicht in entsprechendem Ausmaß erforscht, um endgültige Aussagen über ihre pathogene bzw. immunogene Bedeutung bei einer Infektion und bei einer Vaccination machen zu können. Deshalb wird auch im Rahmen dieser Arbeit auf eine weitere Untersuchung und Charakterisierung dieser Stoffe verzichtet.

Bei der Herstellung des Impfstoffes V_4 wurde der Keim über eine Dauer von 24 Std. unter Standardbedingungen und weiter 24 Std. bei Zimmertemperatur und Tageslicht angezüchtet. Nach 24 Std. und nach 48 Std. wurde die Bouillon für die Dauer von einer Stunde mittels eines Magnetrührers intensiv durchmischt. Nach einer 90-minütigen Hitzeinaktivierung bei 64°C wurden die

korpuskulären Elemente bei 3000 UpM $\hat{=}$ 1500 g 20 min. lang abzentrifugiert. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurden die oberen 2/3 des keimfreien Überstandes abgesaugt und in einem zwischengeschalteten sterilen Gefäß aufgefangen. Der so gewonnene Überstand wurde nochmals, wie eben beschrieben, zentrifugiert und abgesaugt, um eine möglichst korpuskelarme Nährmediumlösung zu erhalten.

2.1. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden weibliche Pirbright-Meerschweinchen (Fa. Bäumler, med. Versuchstiere, Wolfratshausen) mit einem Gewicht zwischen 350 und 500 g verwendet. Die Einteilung mit 26 Tieren pro Versuchsgruppe erfolgte nach Zufallskriterien.

Als Futter erhielten die Tiere Altromin Haltpflege für Meerschweinchen (Fa. Altromin/Lage). Zum Trinken erhielten die Tiere Leitungswasser aus Kleintierwasserspendern. Die Fütterung erfolgte tagsüber nach der Vaccination mit nächtlicher Nahrungskarenz (siehe auch Kap. Impfstoffapplikation),

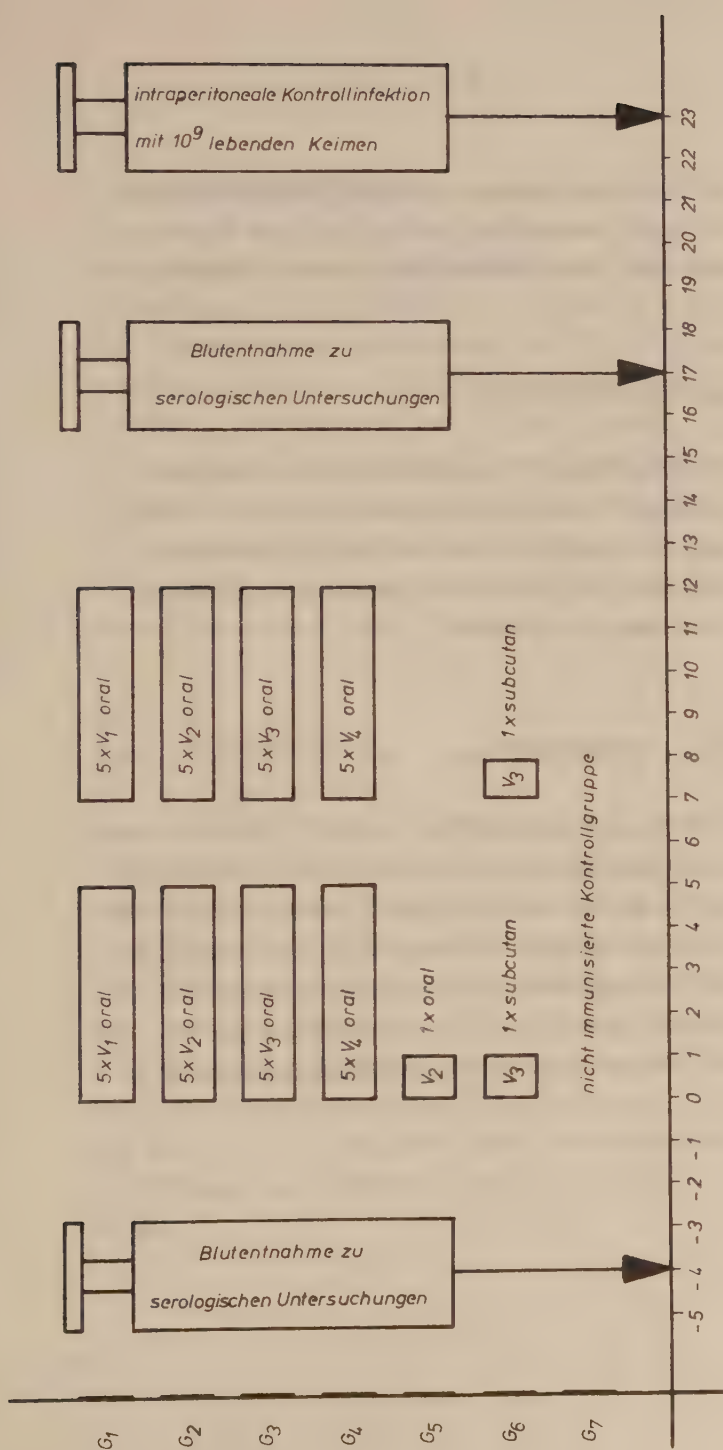


Abb. 1: Applikationsmodus der verschiedenen Impfstoffe bei den verschiedenen Versuchsgruppen sowie zeitliche Markierung der Blutentnahmen und der intraperitonealen Keimexposition mit pathogenen *Ps. aeruginosa*-Erregern.

die Trinkwasserspender wurden 30 Minuten vor Beginn der oralen Vaccination entfernt und nach Beendigung der oralen Immunisierung sofort wieder zugegeben.

2.2. VERSUCHSGRUPPEN

Vor Versuchsbeginn wurden sieben Versuchsgruppen festgelegt. Die Versuchsgruppen unterschieden sich dabei entweder durch Applikation unterschiedlich vorbehandelter Impfstoffe oder durch unterschiedlichen Applikationsmodus.

2.2.1. VERSUCHSGRUPPE G₁

Orale Immunisierung mit der Vaccine V₁ (10^9 Ps. aeruginosa-Lebendkeime pro Milliliter im Anzuchtmedium). Den Tieren der Versuchsgruppe G₁ wurde innerhalb von 12 Tagen, zweimal 5 Tage lang mit 2 Tagen Pause, täglich 1 ml der Vaccine V₁ verabreicht, siehe Abb. 1. Insgesamt wurden innerhalb von 12 Tagen pro Tier 10^{10} lebende Keime im Anzuchtmedium appliziert.

2.2.2. VERSUCHSGRUPPE G₂

Orale Immunisierung mit der Vaccine V₂ (10⁹ Ps. aeruginosa-Lebendkeime pro Milliliter, zweimal in 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendiert). Den Tieren der Versuchsgruppe G₂ wurde innerhalb von 12 Tagen, zweimal 5 Tage lang mit 2 Tagen Pause, täglich 1 ml Vaccine V₂ verabreicht. Insgesamt erhielten die Tiere der Versuchsgruppe V₂ innerhalb von 12 Tagen pro Tier 10¹⁰ lebende, gewaschene und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendierte Keime, siehe Abb. 1.

2.2.3. VERSUCHSGRUPPE G₃

Orale Immunisierung mit der Vaccine V₃ (10⁹ hitzeinaktivierte Ps. aeruginosa-Keime pro Milliliter, zweimal in 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendiert). Den Tieren der Versuchsgruppe G₃ wurde innerhalb von 12 Tagen, zweimal 5 Tage lang mit 2 Tagen Pause, täglich 1 ml Vaccine V₃ verabreicht. Insgesamt erhielten die Tiere der Versuchsgruppe V₃ innerhalb von 12 Tagen pro Tier 10¹⁰ hitzeinaktivierte, gewaschene und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendierte Keime, s. Abb. 1.

2.2.4. VERSUCHSGRUPPE G₄

Orale Immunisierung mit der Vaccine V₄ (lösliche Bakterienprodukte und nichtkorpuskuläre Bestandteile abgestorbener Keime). Den Tieren der Versuchsgruppe G₄ wurde innerhalb von 12 Tagen, zweimal 5 Tage lang mit 2 Tagen Pause, täglich 2,5 ml Vaccine V₄ verabreicht. Insgesamt erhielten die Tiere der Versuchsgruppe G₄ innerhalb von 12 Tagen pro Tier 25 ml antigenhaltiges, korpuskelfreies Nährmedium appliziert, siehe Abb. 1.

2.2.5. VERSUCHSGRUPPE G₅

Orale Immunisierung mit der Vaccine V₂ (siehe 2.2.2.). Den Tieren der Versuchsgruppe G₅ wurden einmal, 23 Tage vor der intraperitonealen Infektion, pro Tier oral 1 ml Vaccine V₂ verabreicht. Insgesamt wurden pro Tier 10⁹ lebende, gewaschene und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendierte Keime verabreicht, siehe Abb. 1.

2.2.6. VERSUCHSGRUPPE G₆

Subcutane Immunisierung mit Vaccine V₃ (siehe 2.2.3.). Den Tieren der Versuchsgruppe G₆ wurde zweimal, im Abstand von einer Woche, die Vaccine V₃ s.c. injiziert. Insgesamt wurden pro Tier 2×10^9 hitzeinaktivierte, gewaschene und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendierte Keime appliziert, siehe Abb. 1.

2.2.7. VERSUCHSGRUPPE G₇

Die Versuchsgruppe G₇ entspricht der nicht vaccinierten Kontrollgruppe.

2.3. ORALE UND PARENTERALE IMPFSTOFFAPPLIKATION

Die orale Vaccineapplikation erfolgte jeweils nach einer mindestens 15-stündigen Nahrungskarenz. Am Tag vor jeder Vaccination wurde das Futter gegen 17 Uhr aus den Tierkäfigen entfernt und am nächsten Tag eine halbe Stunde nach Applikation des Impfstoffes, die immer morgens erfolgte, wieder zugegeben.

Die Trinkwasserspender wurden ebenfalls über den Zeitraum von einer halben Stunde vor Beginn bis zur Beendigung der Vaccination einer Gruppe entfernt.

Bei der Versuchsgruppe G_1 wurde entsprechend der vorausgehenden Keimzählung täglich eine Impfstoffmenge verabreicht, die 10^9 Ps. aeruginosa-Lebendkeime enthielt.

Die Impfstoffe V_2 und V_3 wurden täglich durch Verdünnen der entsprechenden Stammlösungen mit 0,9%iger Kochsalzlösung neu hergestellt.

Der erste Vaccineapplikationstag, "Tag 0", lag 4 Tage nach der ersten Blutentnahme, siehe Abb. 1. Die zweite Blutentnahme erfolgte am 17. Tag, die intraperitoneale Kontrollinfektion am 23. Tag nach der ersten Vaccineapplikation.

Vor jeder Impfstoffapplikation wurden die Versuchstiere mit "Aether pro narcosi" narkotisiert. Als Maulspreizer diente eine geschlossene quer hinter den Nagezähnen eingeführte Peanklemme, sodaß durch den freien Raum zwischen Griffbranchen und Raster eine Gummisonde (Fa. W. RUSCH, Waiblingen Wttbg.,

Nr. 6) gefahrlos und ohne Schwierigkeiten 10 - 15 cm, also mit Sicherheit in den Magen der Versuchstiere, eingeführt werden konnte.

Der Impfstoff wurde über die Gummisonde mittels einer 5ml-Record-Einmalspritze verabreicht. Nach der Impfstoffapplikation wurden 10 ml Leitungswasser über die Sonde nachgespritzt, um Vaccineverlusten durch Rückstände im Schlauch vorzubeugen. Weiterhin sollte hiermit eine rasche Magen-Duodenal-Passage des Impfstoffes unterstützt werden.

Die parenteral immunisierten Tiere erhielten die Injektionen in einer kurzzeitigen Äthernarkose subcutan unter die seitliche Bauchhaut. Die Boosterinjektion erfolgte in einem zeitlichen Abstand von 8 Tagen an der kontralateralen Seite der Bauchhaut.

3.1. KONTROLLINFEKTION

Als aussagekräftigste Untersuchung zur Beurteilung des Vaccinationserfolges diente die Letalitätbestimmung nach intraperitonealer Keimexposition mit 10⁹ pathogenen lebenden *Ps. aeruginosa*-Erregern am

23. Tag nach der ersten Vaccineapplikation, siehe Abb. 1. Hierzu wurde derselbe *Ps. aeruginosa*-Stamm wie zur Vaccineherstellung verwendet.

In Vorversuchen mit jeweils 4 Tieren, beginnend mit einer Keimdosis von 10^6 bis 10^{10} wurde die LD_{100} nach intraperitonealer Infektion ermittelt. Aufgrund dieser Vorversuche wurde eine Dosis von 10^9 lebenden *Ps. aeruginosa*-Erregern zur intraperitonealen Kontrollinfektion gewählt. Die Keimsuspension, die zur Kontrollinfektion zur Anwendung kam, entsprach in ihrer Zusammensetzung der Vaccine V_2 .

Die Intraperitoneale Keimapplikation erfolgte während einer Äthernarkose. Nach Alkoholdesinfektion der Injektionsstelle an der Bauchhaut wurde mittels einer 2ml-Record-Einmalspritze über eine Record-Einmalkanüle Nr. 14 jedem Versuchstier 1ml Suspension, entsprechend 10^9 lebende, gewaschene und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendierte *Ps. aeruginosa*-Erreger, in den Intraperitonealraum injiziert.

Die Messung der Letalität erfolgte im 24-Stunden-Intervall. Alle ad exitum gekommenen Tiere wurden sezziert und ein aus der Bauchhöhle gewonnener Ab-

strich auf *Ps. aeruginosa*-Keime untersucht. Bei der Inspektion der Bauchhöhle wurde auf Zeichen einer präfinal abgelaufenen Peritonitis, wie z. B. vermehrte Gefäßzeichnung an den Gedärmen, vermehrtes bzw. eitrig-trübes Exsudat sowie Fibrinauflagerungen auf den Abdominalorganen geachtet.

Versuchstiere, die keinerlei Entzündungszeichen aufwiesen oder aufgrund der Punktion Verletzungen intraabdominaler Organe zeigten, wurden bei der Auswertung nicht mitgewertet.

3.2. BAKTERIENAGGLUTINATION

Durchgeführt wurde eine Soma- bzw. O-Agglutination. Im Gegensatz zur Geißel- oder H-Agglutination sind bei der O-Agglutination die antigenen Strukturen in der Bakterienhülle gebunden. Bei der Herstellung der Keimsuspension zur O-Agglutination (sog. Widal-sche Agglutinationsprobe) kam derselbe *Ps. aeruginosa*-Stamm wie zur Impfstoffherstellung zur Anwendung. Von den Eiernährböden wurde der Keim zuerst in Reagenzröhrchen mit 10ml Dextrosebouillon überimpft und 20 Std. bei 37°C angezüchtet. Hier-von wurde 1ml in einem 1000ml-Kolben 20 Std. bei

37°C weitergezüchtet. Bei 3000 UpM $\hat{=}$ 1500 g wurden die Keime abzentrifugiert und das erhaltene Sediment zweimal in 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschen und in 100ml 0,9%-iger Kochsalzlösung resuspendiert. Unter Schütteln wurde tropfenweise die gleiche Menge von 96%-igem unvergälltem Äthylalkohol zugegeben, das Gemisch 20 Std. bei 37°C inkubiert und dann als Stammlösung im Kühlschrank bei 4°C gelagert (58). Durch die Behandlung mit Äthylalkohol konnten selektiv, ohne Schädigung der Soma- bzw. O-Antigene, die H-Antigene denaturiert werden.

Zur Herstellung der Gebrauchslösung wurde ein Teil der Stammemulsion mit 0,9%-iger Kochsalzlösung entsprechend einer McFarland III-Trübung eingestellt (McFarland III-Trübung $\hat{=}$ 0,3ml einer 0,8%-igen $\text{BaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -Lösung + 9,7ml einer 1%-igen H_2SO_4). Diese Dichte entspricht einer Keimzahl von 10^9 K/ml.

Zur O-Agglutination wurde von jedem zu untersuchenden Serum mit 0,9%-iger Kochsalzlösung eine halbwertige Verdünnungsreihe angelegt. Die Ergebnisse der Agglutinationsreaktion wurden nach einer Inkubation von 14 Std. bei 37°C und nachfolgendem

sechsstündigen Stehenlassen bei Zimmertemperatur abgelesen und als positiv gewertet, wenn beim Beklopfen des Gläschenbodens der Satz körnig aufstieg; als negativ, wenn sich stattdessen ein diffuser Schleier bildete. In Zweifelsfällen erfolgte die Entscheidung unter Berücksichtigung der beiden benachbarten Gläschen.

Die Angabe der einzelnen Titerstufen geschah aus Gründen der statistischen Auswertung im negativen binären Logarithmus ($\lg a \hat{=} \log_2 a$) (17).

Beispiel: $1 : 4 = -\lg 2$
 $1 : 8 = -\lg 3$
 $1 : 16 = -\lg 4$

3.3. IMMUNPRÄZIPITATION NACH MANCINI

Mittels der radialen Immundiffusion nach MANCINI, CARBONARA und HEREMANS (89) wurden die Sera der Versuchstiere vor und nach der Immunisierung auf das Verhalten folgender Proteinfractionen untersucht: Gesamtimmunglobuline, Immunglobulinfraktionen IgG und IgM und Komplementfraktion C₃.

Die zu untersuchenden Sera wurden mit 0,9%-iger Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 10 verdünnt. Mittels eines Partigen-Dispensers konnten exakt 5ul dieser Serumverdünnung in die Stanzlöcher der anti-serumhaltigen Agaroseplatten eingefüllt werden. Um die Ergebnisse einzelner Platten, die zur Bestimmung der gleichen Proteinfraction dienten, miteinander vergleichen zu können, wurden die ersten 3 Stanzlöcher jeder Agaroseplatte mit Meerschweinchennormalserum (Fa. Byck Mallinckrodt/Dietzenbach) in den Verdünnungen 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 20 beschickt. Aus den Flächen dieser Kontrollpräzipitate ließ sich ein Multiplikationsfaktor errechnen, mittels dem die Ergebnisse der einzelnen Platten auf vergleichbare Werte umgerechnet werden konnten.

Die Diffusionszeit betrug bei Raumtemperatur (21°C) 72 Stunden. Während dieser Diffusionszeit wurden die Platten auf einem exakt ausgerichteten Horizontal-tisch in einer Feuchtkammer gelagert.

Nach zweimaligem Auswaschen nicht präzipitierter Proteine mit 0,1-molarer Kochsalzlösung, anschließend Spülen mit destilliertem Wasser, Pressen,

Trocknen und Anfärben mit Coomassie Brilliant Blue (Fa. Behringwerke AG) wurden die Ergebnisse mit einer 6 x vergrößernden Meßlupe abgelesen.

3.3.1. HERSTELLUNG DER AGAROSEPLATTEN

Um eine ausreichende mechanische Festigkeit der geleeartigen Diffusionsschicht zu erhalten, wurde die Agarose in 1,5%-iger Verdünnung hergestellt. Hierzu wurden 1,5 g Agarose (Fa. Behringwerke AG) in 100ml kochendem Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst und nach Abkühlung auf 50°C im Wasserbad wurde das Antiserum zugegeben (Antiserum : Agarosegel + Antiserum = 1 : 20).

Das Gießen der Platten erfolgte am Horizontaltisch bei einer Agarosetemperatur von 50°C. Die Agarose wurde auf Glasplatten mit einer Größe von 100 mm x 100 mm x 1 mm gegossen. Pro Platte benötigte man 15ml Agarosegel; die Dicke der erstarrten Agaroseschicht betrug 1,5 mm, die Größe entsprach der Glasplattengröße.

Pro Platte wurden 36 Löcher in 6 Reihen á 6 Löcher mittels einer Stanzkanüle mit Teleskop-Absaugvorrichtung gestanzt.

3.3.2. IMMUNDIFFUSION

Die spezifischen Antikörper waren somit in Form entsprechender Antisera (Anti-IgG-, Anti-IgM-, Anti-Gesamtgammaglobulin und Anti-C₃-Serum) homogen in der Agaroseschicht gelöst. Das zu untersuchende Serum diffundierte von den Stanzlöchern aus kreisförmig in das Agarosegel, wo es mit dem entsprechenden Antiserum präzipitierte. Bei gleichbleibendem Antiserumgehalt der Agaroseschicht veränderte sich die Größe der Präzipitatringe entsprechend der zu untersuchenden Proteinkonzentration des diffundierenden Serums.

3.3.3. MATERIALIEN ZUR PLATTENHERSTELLUNG

Agarose (Fa. Behringwerke AG/Marburg)

Puffer zum Lösen des lyophilisierten Anti-Meerschweinchen-Gesamtgammaglobulins (8,5 g NaCl + 8,62 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 2,48 g KH_2PO_4 auf 1 l Aqua bidestillata $\hat{=}$ pH 7,2)

Kaninchen-anti-Meerschweinchen-Gesamtgammaglobulin (Fa. Behringwerke AG/Marburg)

Kaninchen-anti-Meerschweinchen IgG H+L (Fa. Nordic Immunological Laboratories / Tilburg in den Niederlanden)

Schaf-anti-Meerschweinchen IgM (Fa. Nordic/Tilburg)

Ziegen-anti-Meerschweinchen B1c (C₃) (Fa. Nordic/
Tilburg)

Normal-Meerschweinchenserum (Fa. Nordic/Tilburg)

Glasplatten 100 mm x 100 mm x 1 mm (Fa. Behring-
werke AG/Marburg)

Stanzschablone und Teleskop-Stanzkanüle Ø 2 mm
(Fa. Behringwerke AG/Marburg)

Partigen-Dispenser mit zugehörigen Glaskapillaren
(Fa. Behringwerke AG/Marburg)

Färbelösung: 5 g Coomassie Brilliant Blue R (Fa. Beh-
ringwerke AG/Marburg) + 450ml Äthanol 96%-ig +
450ml Aqua bidest. + 100ml Eisessig

Entfärbelösung: 450ml Äthanol + 450ml Aqua bidest. +
100ml Eisessig

Spüllösung: 0,1M NaCl-Lösung

Meßlupe mit 6x-Vergrößerung (Fa. Behringwerke AG/
Marburg)

4. ANGABEN ZUR AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE UND ZU DEN STATISTISCHEN BERECHNUNGEN

4.1. BERECHNUNG DES WIRKUNGSINDIZES

Die Beurteilung der Wirksamkeit der einzelnen Impfstoffe erfolgte anhand der Letalitätsbestimmung nach intraperitonealer Infektion mit dem gleichen, wie zur Vaccination verwendeten Keim. Von der am 5. Tag post infectionem ermittelten Letalität wurde der Wirkungsindex der Vaccine errechnet.

$$\text{Wirkungsindex } W = \frac{a - b}{a} \times 100$$

a = Anzahl der infizierten Tiere

b = Anzahl der nach Kontrollinfektion gestorbenen Tiere

Das Zeitintervall von 5 Tagen wurde gewählt, da zu erwarten war, daß sich während dieser Zeit die akute Phase der intraperitonealen Entzündung abspielt (siehe auch Kap. C-1.1.).

Andere Untersucher, z. B. RAETTIG (104) oder LIETZ (83) ermittelten bei ihren Untersuchungen die Letalität (dort als Mortalität bezeichnet) 6 Tage post infectionem, also nahezu nach dem gleichen Zeitintervall wie bei der vorliegenden Studie.

In dieser Studie wurde der Wirkungsindex der applizierten Impfstoffe anhand der Letalität der Versuchstiere ermittelt. Da dieses Verfahren bisher von anderen Autoren angewandt wurde, die den Schutz nach einer Vaccination nicht nach labortechnischen Größen, sondern nach "klinischen Kriterien" beurteilten, lassen sich die Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen bisheriger Veröffentlichungen vergleichen.

Bei dieser Auswertungsmethode wird allerdings nur die Letalität bis zum festgesetzten Tag post infectionem erfaßt. Die Kinetik der Absterberate innerhalb dieser Zeitspanne wird bei dieser Auswertungsmethode nicht berücksichtigt. Tiere, die nach der Vaccination eine gewisse Teilimmunität entwickelt haben, werden eine Infektion länger überleben als Tiere, die nach Vaccination fast keinen Immunschutz entwickelten. Es ist deshalb von Bedeutung, ob ein Versuchstier am ersten oder am fünften Tag post infectionem ad exitum gekommen ist.

Deswegen wurde in der vorliegenden Studie der Wirkungsindex der Vaccinen zusätzlich mit einer weiteren Methode ermittelt, die die Dynamik der Tier-

zahlabnahme innerhalb des beobachteten Zeitraumes mitberücksichtigt.

Der mit dieser Auswertungsmethode errechnete Wirkungsindex wurde mit W_d bezeichnet.

Der W_d -Wirkungsindex wurde folgendermaßen errechnet: Es wurde der arithmetische Mittelwert der Überlebenszeit einer Versuchsgruppe innerhalb des Zeitraumes der ersten neun Tage post infectionem errechnet und zu der Anzahl der Tage des Beobachtungszeitraumes ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Wirkungsindex } W_d = \frac{\bar{x}_b}{b} \times 100$$

$\bar{x}_b \hat{=}$ Mittelwert der Überlebenszeit des beobachteten Zeitraumes einer Versuchsgruppe

$b \hat{=}$ beobachteter Zeitraum in Tagen

Aus beiden Wirkungsindizes, W und W_d , konnte ein gemeinsamer Wirkungsindex W_g errechnet werden.

$$\text{Wirkungsindex } W_g = \frac{W + W_d}{2}$$

Ein Vergleich der einzelnen Wirkungsindizes findet sich in Tabelle 1 (Kap. C - 1.1.).

Als Beobachtungszeitraum b bei der Berechnung des Wirkungsindex W_d wurde die Zeitspanne bis zum neunten Tag p. i. gewählt. Innerhalb dieses Zeitraumes starben alle Tiere, die nach der Kontrollinfektion ad exitum gekommen waren. Damit wurden bei dieser Auswertung auch die Tiere berücksichtigt, die an den indirekten Folgen der Kontrollinfektion starben. Diese Tiere hatten retrospektiv gesehen sicherlich eine so starke Immunität entwickelt, daß sie den akuten Infektionszustand gerade noch überwinden konnten, an den Infektionsfolgen, wie Verwachsungen aufgrund der starken entzündlichen Veränderungen der Abdominalorgane, jedoch dann verendeten.

4.2. BERECHNUNG DER MITTELWERTE (52; 126)

Die Angaben der Wirkungsindizes, der Agglutinationsreaktionen sowie der Flächen der Immundiffusionsreaktionen erfolgten für die einzelnen Gruppen mittels der Berechnung des statistischen Mittelwertes $\bar{x}$ nach folgender Berechnung:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$\bar{x}$ = Mittelwert; $\sum_{i=1}^n x_i$ = Summe der einzelnen gemessenen

x-Werte von x_1 bis x_n ; n = die Anzahl der gemessenen Einzelwerte.

Als Maß für die Streuung wurden die Standardabweichung s_x sowie der mittlere Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ errechnet.

$$s_x = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right)^{-2}$$

$$s_{\bar{x}} = s_x / n^{-2}$$

4.3. T-TEST

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden die Mittelwerte der vaccinierten Prüfgruppen mit einer nichtvaccinieren Kontrollgruppe verglichen. Dabei wurde versucht, die Alternativhypothese H_1 zu beweisen, nämlich daß zwischen den Meßwerten der Prüfgruppen und der Kontrollgruppe im Mittel ein Unterschied besteht.

Nachdem festgestellt worden war, daß beide Kollektive normalverteilt waren, erfolgte der statistische Ver-

gleich mittels des "T-Tests" für unverbundene Proben. Mit diesem Test konnte errechnet werden, ob die Differenz der Mittelwerte der immunisierten Prüf- bzw. Versuchsgruppen und der nicht immunisierten Kontrollgruppe signifikant von Null abweicht. Errechnet wurden das Prüfmaß t sowie die Anzahl der Freiheitsgrade v .

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{(\text{SAQ}_1 + \text{SAQ}_2)^{-2}} \left(\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2} (n_1 + n_2 - 2) \right)^{-2}$$

$$v = n_1 + n_2 - 2$$

$\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ = Mittelwerte; SAQ_1 und SAQ_2 = Summen der Abweichungsquadrate; n_1 und n_2 = Beobachtungsanzahlen der beiden Stichproben.

Mittels des Prüfmaßes t und der Anzahl der Freiheitsgrade v konnte anhand einer "Tabelle der Signifikanzschranken der Student-Verteilung" die Signifikanzwahrscheinlichkeit p ermittelt werden.

Unter Signifikanz versteht man die Sachaussage, daß sich die Meßergebnisse der Prüfgruppe von den Meßergebnissen der Kontrollgruppe mit einer gewissen Irr-

tumswahrscheinlichkeit p , die kleiner oder gleich einem vor dem Versuch festgelegten Wert ist, unterscheiden. Im medizinischen Bereich wird die Irrtumswahrscheinlichkeit im allgemeinen mit $p \leq 0,01$ gewählt. Dies bedeutet, daß man sich bei der mathematisch geprüften Behauptung höchstens in einem von 100 Fällen irrt. Nach dieser Festlegung, die auch in dieser Studie als Niveau für die Aussage der Signifikanz einer Behauptung festgelegt wurde, sind alle Aussagen über den Unterschied der Meßergebnisse zweier Beobachtungsgruppen, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$ gemacht werden können, als signifikant, im Sinne der Alternativhypothese H_1 , anzusehen.

Unter Alternativhypothese H_1 versteht man die hypothetische Behauptung, daß sich die Meßergebnisse zweier Beobachtungsgruppen im Mittel unterscheiden.

C. DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE IN DREI KAPITELN

1. Ergebnisse der Letalität der Versuchstiere nach intraperitonealer Infektion mit *Ps. aeruginosa*
2. Ergebnisse der Bakterienagglutination vor und nach der Applikation der verschiedenen Vaccinen
3. Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtimoglobuline, der Immunglobuline IgG, IgM sowie der Komplementfraktion C₃

1. ERGEBNISSE DER LETALITÄT DER VERSUCHSTIERE NACH INTRAPERITONEALER INFEKTION

Am 23. Tag nach Beginn der Vaccination wurden alle Tiere einer intraperitonealen Keimexposition mit 10^9 lebenden *Ps. aeruginosa*-Erregern unterzogen. Da bekannt ist, daß es nach oraler Immunisierung, trotz nachweislicher Aktivierung des Immunsystems, nicht regelmäßig zu einem Anstieg der spezifischen Antikörper kommt, wurde als wesentlichem Erfolgsnachweis des aufgebauten Impfschutzes der Messung der Letalität die ausschlaggebende Bedeutung zugemessen. Mit ihr konnte als klinisch wichtigstes Ergebnis der tatsächlich aufgebaute Impfschutz nach oraler Vaccination erfaßt werden.

Die Letalitätsmessung erfolgte im 24-Stunden-Intervall. Aus den Ergebnissen kann ersehen werden, daß mehr als 95 % aller ad exitum gekommenen Tiere innerhalb der ersten 5 Tage post infectionem starben. Innerhalb dieser Zeitspanne spielte sich die akute Phase der Entzündung in der Abdominalhöhle ab. Post mortem zeigten alle Tiere, die innerhalb dieses Zeitraumes starben und seziiert wurden die

Zeichen einer hochakuten, präfinal abgelaufenen Peritonitis, kenntlich durch reichlich trübes Exsudat, Fibrinausschwitzungen auf den intraabdominellen Organen sowie regelmäßig *Ps. aeruginosa*-Nachweis vom Bauchhöhlenabstrich.

Tiere, die später ad exitum kamen, zeigten meist das Bild von Verwachsungen und die Bildung von Konglomeratumoren des gesamten Magen-Darm-Traktes.

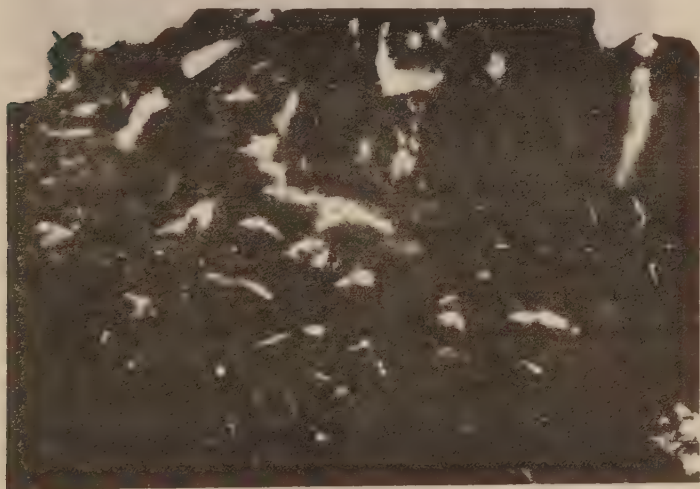


Abbildung 2: Sectionssitus eines Meerschweinchens nach i.p.-Keimexposition mit 10^9 *Ps. aeruginosa*-Keimen.

Fibrinbedeckte Leberoberfläche sowie Fibrinausschwitzungen auf den Därmen (Pfeil) und auf dem Peritoneum parietale (Pfeil).



Abbildung 3: Normaler Meerschweinchensitus.

1.1. ERGEBNISSE DER UNTERSCHIEDLICH VACCINIERTEN
GRUPPEN UND VERGLEICH MIT DER NICHT VACCINIERTEN
KONTROLLGRUPPE

Anhand von Abb. 4 - Abb. 10 wird der Verlauf der
gestorbenen Tiere während der ersten 14 Tage p. i.
beschrieben.

Um die Überlebensrate der einzelnen Gruppen untereinander mathematisch bzw. statistisch auswerten und vergleichen zu können, wurde ein Vergleichsdatum, der 5. Tag p. i., aus bereits beschriebenen Gründen festgesetzt. Aus der Letalität bis zum 5. Tag p. i. wurde der Wirkungsindex W einer Gruppe errechnet (siehe auch Kap. B - 4.2.).

Dieses Zeitintervall wurde deswegen gewählt, da sich innerhalb dieses Zeitraumes die akute Entzündungsphase abspielte. Innerhalb der ersten 5 Tage starben 95 % aller ad exitum gekommenen Tiere. All diese Tiere wurden seziert und zeigten hier Zeichen einer hochakuten, präfinal stattgefundenen Entzündung im Bereich der Abdominalhöhle, wie z. B. reichlich vorhandenes trübes Exsudat und Fibrinauflagerungen auf den intraabdominalen Organen (siehe Abb. 2). Vom Abstrich aus der Bauchhöhle konnte regelmäßig *Ps. aeruginosa* isoliert werden.

Später verstorbene Tiere zeigten bei der Section das Bild starker Verwachsungen und Bildung von Konglomerattumoren des Gastrointestinaltraktes. Der hierbei entnommene Abstrich war stets negativ. Als Todesursache konnte ein mechanischer Ileus

nur vermutet werden. Aufgrund der guten Abwehrlage überlebten diese Tiere vermutlich das akute Infektionsstadium, starben jedoch dann an den indirekten Folgen.

Mit einer weiteren Methode, die die Dynamik der Tierzahlabnahme berücksichtigt, wurde der statistische Mittelwert der Überlebenstage einer Gruppe einschließlich bis zu neuntem Tag p. i. errechnet. Die Zeitspanne von 9 Tagen wurde gewählt, da alle Tiere, die ad exitum kamen, innerhalb dieses Zeitraumes starben (siehe Kap. B - 4.1.).

So betrug beispielsweise die durchschnittliche Überlebenszeit der Gruppe G_1 $\bar{x} = 7,26$ Tage, der Gruppe G_7 $\bar{x} = 1,92$ Tage. Der daraus resultierende Wirkungsindex W von G_1 betrug 80,7 im Gegensatz zu W mit 21,3 von G_7 .

Zieht man den Wirkungsindex W und den Wirkungsindex W_d zu einem gemeinsamen Wirkungsindex zusammen, so ergibt sich $W_g = \frac{W + W_d}{2}$. Das Ergebnis von W_g beinhaltet somit die mittlere Überlebenszeit, wie auch die Letalität einer Versuchsgruppe.

Aus Gründen der besseren Übersicht und der besseren Vergleichsmöglichkeit wurde bei der Darstellung der Ergebnisse die Kontrollgruppe G_7 bzw. G_k den anderen Versuchsgruppen vorangestellt.

VERSUCHSGRUPPE G_7 = KONTROLLGRUPPE:

Die Tiere der Kontrollgruppe G_7 wurden ohne vorausgehende Immunisierung am 23. Tag nach Versuchsbeginn mit 10^9 Ps. aeruginosa-Keimen intraperitoneal belastet. Das Ergebnis diente als Vergleichsgrundlage zu den mit verschiedenen Ps. aeruginosa-Vaccinen oral bzw. parenteral behandelten Versuchsgruppen.

Die Ausgangstierzahl vor der intraperitonealen Keimexposition betrug $n = 26 \hat{=} 100\%$. Wie aus der Kurve der Abb. 4 ersichtlich ist, starben die meisten Tiere der Kontrollgruppe G_7 innerhalb der ersten 24 Std. p. i. (post infektionem). So betrug die Letalität L am ersten Tag p. i. $69,23\%$ ($\hat{=} 18$ Tieren) und am 2. Tag $19,23\%$ ($\hat{=} 5$ Tieren), entsprechend einer Gesamtletalität von $88,46\%$ innerhalb der ersten 48 Std. Ein weiteres Tier kam am 4. Tag p. i. ad

exitum. Zwei Tiere überlebten die gesamte Beobachtungszeit. Bis einschließlich den 5. Tag p. i. (Vergleichsdatum der Letalitätsberechnung) betrug $L = 92,3 \%$.

Die Berechnung der durchschnittlichen Gruppenüberlebenszeit der ersten 9 Tage ergab einen Mittelwert von $\bar{x} = 1,92 \text{ d}$; $s_x = \pm 2,19$; $s_{\bar{x}} = \pm 0,43$.

Aus der Letalität bis einschließlich den 5. Tag p. i. und der durchschnittlichen Gruppenüberlebenszeit der ersten 9 Tage ließen sich folgende Wirkungsindizes errechnen (siehe auch Kap. A - 4.1.).

Wirkungsindex $W = 7,7$; $W_d = 21,3$; $W_g = 14,5$

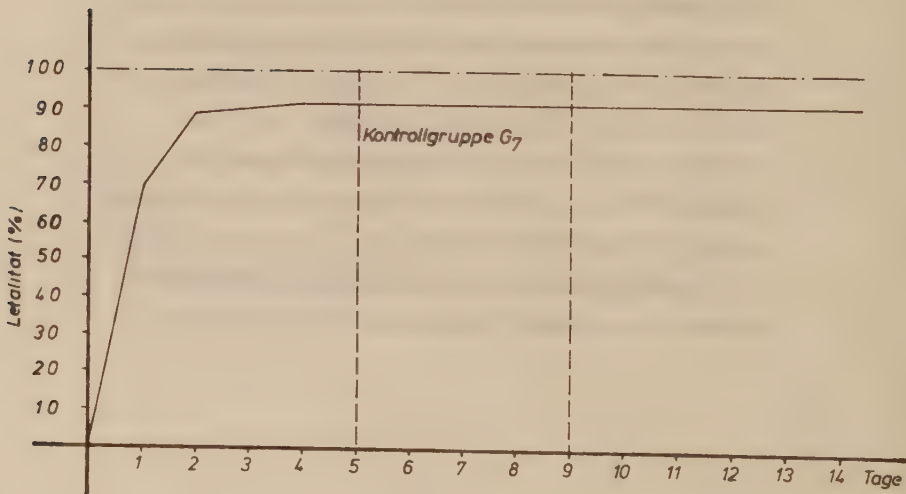


Abb. 4: Anstieg der Letalität der Gruppe G_7 nach intraperitonealer Kontrollinfektion in Relation zur Zeit (in Tagen).

VERSUCHSGRUPPE G₁:

Die Tiere der Versuchsgruppe G₁ wurden 10 Tage lang auf peroralem Weg mittels einer im Magen liegenden Gummisonde enteral mit dem Impfstoff V₁ (10⁹ lebende Keime im Anzuchtmedium) vacciniert. Die intraperitoneale Keimexposition erfolgte am 11. Tag nach der letzten Impfstoffapplikation (siehe Abb. 1, Kap. B - 2).

Die Ausgangstierzahl vor der Kontrollinfektion betrug $n = 23 \hat{=} 100\%$. In der Abb. 5 ist die Letalität der Gruppe G₁ im Verlauf der ersten 14 Tage p. i. im Vergleich zur Kontrollgruppe G₇ graphisch dargestellt. Die Letalität von G₁ betrug am ersten Tag p. i. 17,4 % ($\hat{=} 4$ Tieren). Am zweiten Tag starb ein weiteres Tier,

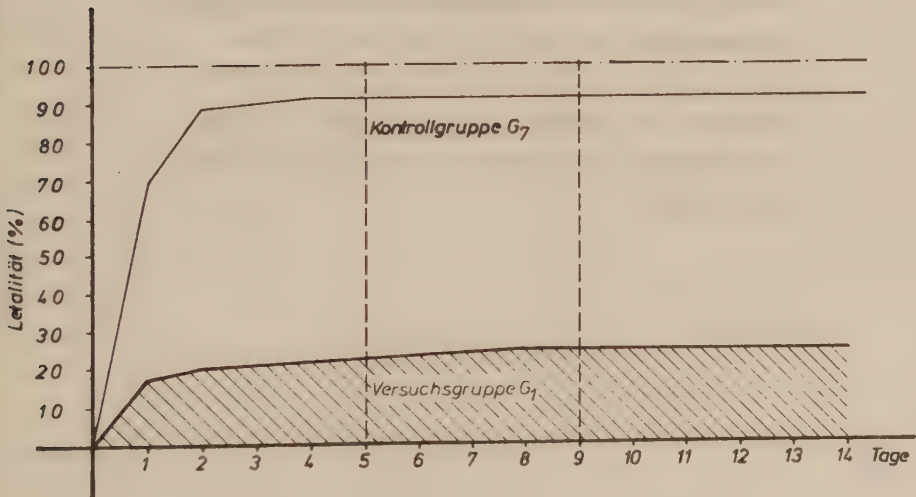


Abb. 5: Anstieg der Letalität der Gruppe G₁ nach intraperitonealer Kontrollinfektion in Relation zur Zeit (in Tagen).

was einer Letalität von 21,3 % innerhalb der ersten 48 Std. p. i. entspricht. Am 8. Tag p. i. kam ein weiteres Tier ad exitum, bei dem sich jedoch bei der Section starke Verwachsungen des Darmbauches zu einem Konglomerattumor zeigten. Die Ubrigen Tiere Überlebten den weiteren Beobachtungszeitraum. Bis einschließlich den 5. Tag p. i. betrug die Letalität der Gruppe G_1 $L = 21,7 \%$.

Aus der Berechnung der durchschnittlichen Gruppenüberlebenszeit der ersten 9 Tage p. i. ergab sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 7,26$ d; $s_x = \pm 3,28$;
 $s-x = \pm 0,68$.

Folgende Wirkungsindizes ließen sich aus der Letalität bis einschließlich den 5. Tag p. i. und der durchschnittlichen Gruppenüberlebenszeit errechnen:
Wirkungsindex $W = 78,3$; $W_d = 80,7$; $W_g = 79,5$.

Gegenüber der Kontrollgruppe unterschied sich der Wirkungsindex W der Gruppe G_1 mit $p < 0,0005$ hochsignifikant.

VERSUCHSGRUPPE G_2 :

Die Tiere der Versuchsgruppe G_2 wurden 10 Tage lang mit dem Impfstoff V_2 (10^9 lebende Keime, zweimal gewaschen und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendiert) mittels einer im Magen liegenden Gummisonde enteral vacciniert. Die intraperitoneale Keimexposition erfolgte wie bei der Gruppe G_1 am 11. Tag nach der letzten Impfstoffapplikation (siehe auch Abb. 1, Kap. B - 2).

Die Ausgangstierzahl vor der intraperitonealen Keimexposition betrug $n = 25 \pm 100\%$. Die Abb. 5 zeigt den Verlauf der Letalität während der ersten 14 Tage post infectionem. Am ersten Tag p. i. starben 4 Tiere; dies entspricht einer Letalität von $L = 16\%$.

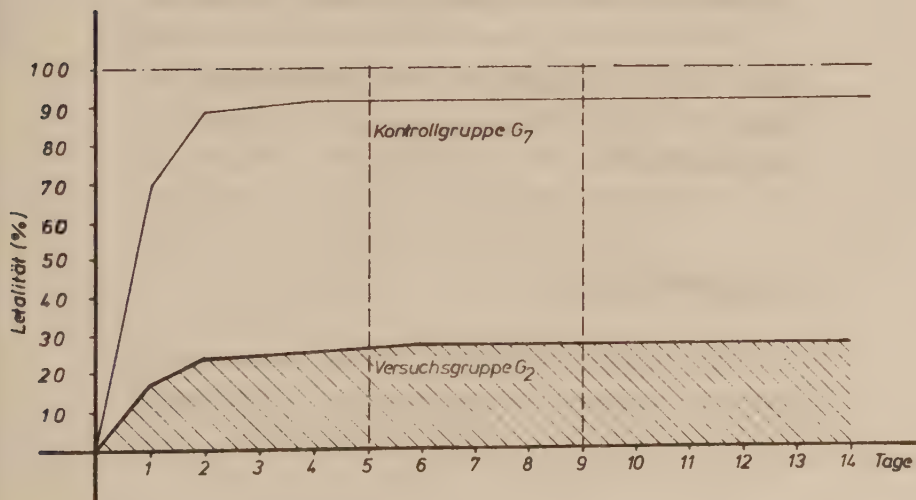


Abb. 6: Anstieg der Letalität der Gruppe G_2 nach intraperitonealer Kontrollinfektion in Relation zur Zeit (in Tagen).

Durch den Tod zweier weiterer Tiere betrug die Letalität nach dem zweiten Tag 24 %. Am sechsten Tag p. i. kam noch ein weiteres Tier ad exitum. Bei diesem Tier fand sich bei der Section ein Konglomerattumor des Darmes, bedingt durch starke Verwachsungen. Bis einschließlich den 5. Tag p. i. ergab sich bei der Gruppe G_2 eine Letalität von $L = 24 \%$.

Die Berechnung der durchschnittlichen GruppenÜberlebenszeit von G_2 ergab einen Mittelwert von $\bar{x} = 7,00$ d; $s_x = +3,35$; $s_{\bar{x}} = +0,67$.

Aus der Letalität bis einschließlich den 5. Tag p. i. und der durchschnittlichen Überlebenszeit der Gruppe G_2 konnten folgende Wirkungsindizes errechnet werden: Wirkungsindex $W = 76,0$; $W_d = 77,8$; $W_g = 76,9$

Gegenüber dem Wirkungsindex W der Kontrollgruppe unterschied sich W der Gruppe G_2 mit $p < 0,0005$ hochsignifikant.

VERSUCHSGRUPPE G_3 :

Die Tiere der Versuchsgruppe G_3 wurden 10 Tage lang über eine Magensonde mit dem Impfstoff V_3 (10^9 hitze-

inaktivierte, zweimal gewaschene und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendierte Keime) enteral vacciniert. Die intraperitoneale Keimexposition erfolgte wie bei den Gruppen G_1 und G_2 am 11. Tag nach der letzten Impfstoffapplikation (siehe auch Abb. 1, Kap. B - 2).

Die Ausgangstierzahl vor der intraperitonealen Kontrollinfektion betrug $n = 22 \pm 100 \%$. Die Abb. 7 zeigt den Anstieg der Letalität nach intraperitonealer Keimexposition in Relation zur Zeit. Am ersten Tag p. i. betrug die Letalität bei 5 ad exitum gekommener Tiere 22,7 % bis einschließlich dem zweiten bzw. dem dritten Tag durch den Tod jeweils eines weiteren Tieres 27,3 % bzw. 31,8 %. Ein weiteres Tier kam am 6. Tag p. i. ad exitum; es zeigte bei der Section starke Verwachsungen der Darmschlingen. Bis einschließlich dem 5. Tag p. i. fand sich bei der Gruppe G_3 eine Letalität von $L = 31,8 \%$.

Die Berechnung der durchschnittlichen GruppenÜberlebenszeit der ersten 9 Tage ergab einen Mittelwert von $\bar{x} = 6,45$ d; $s_x = +3,60$; $s_{\bar{x}} = +0,77$.

Aus der Letalität bis einschließlich den 5. Tag p. i. und der durchschnittlichen Gruppenüberlebenszeit der ersten 9 Tage ließen sich folgende Wirkungsindizes errechnen: Wirkungsindex $W = 68,2$; $W_d = 71,7$;
 $W_g = 69,7$

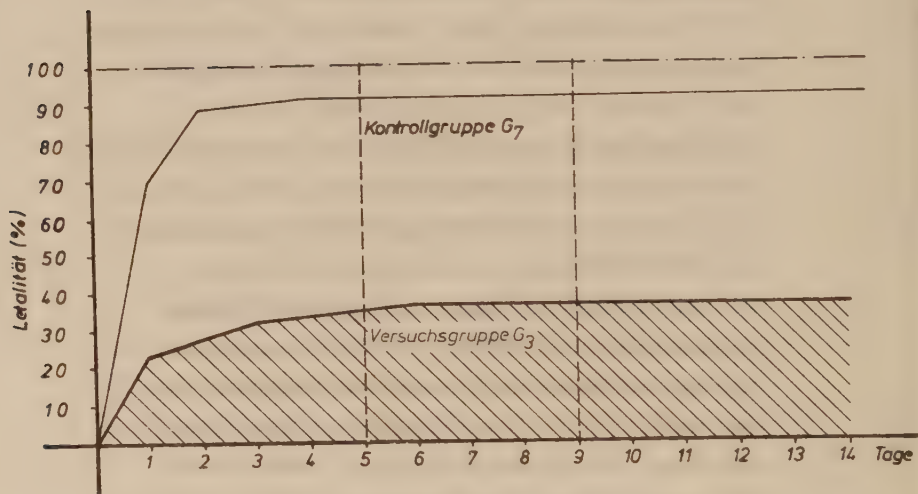


Abb. 7: Anstieg der Letalität der Gruppe G_3 nach intraperitonealer Kontrollinfektion in Relation zur Zeit (in Tagen).

Der Wirkungsindex W der Versuchsgruppe G_3 unterschied sich mit $p < 0,0005$ hochsignifikant von dem der Kontrollgruppe.

VERSUCHSGRUPPE G₄:

Die Tiere der Versuchsgruppe G₄ wurden 10 Tage lang über eine Magensonde mit dem Impfstoff V₄ (2,5 ml korpuskelfreie Nährbouillon, von der die Keime nach 48-stündiger Bebrütung und nachfolgender Hitzeinaktivierung abzentrifugiert worden waren) enteral vacciniert. Die intraperitoneale Belastungsinfektion erfolgte wie bei den Gruppen G₁ bis G₃ am 11. Tag nach der letzten Impfstoffapplikation (siehe Abb. 1, Kap. B - 2).

Die Ausgangstierzahl vor der intraperitonealen Keimexposition betrug $n = 25 \hat{=} 100 \%$. Wie aus der Abb. 8 ersichtlich ist, betrug die Letalität am ersten Tag p. i. 32,0 % ($\hat{=} 8$ Tieren). Am 2. Tag starben zwei weitere Tiere; dies entspricht einer Letalität von 44,0 % nach 48 Std. p. i. Am siebten Tag kam noch ein weiteres Tier ad exitum. Bis einschließlich den 5. Tag p. i. ergab sich eine Letalität von $L = 44,0 \%$.

Für die durchschnittliche Gruppenüberlebenszeit der ersten 9 Tage p. i. konnte folgender Mittel-

wert errechnet werden: $\underline{x} = 5,52$; $s_{\underline{x}} = \pm 3,87$;
 $s_{\underline{x}} = \pm 0,77$.

Aus der Letalität bis einschließlich den 5. Tag p. i. und der durchschnittlichen Gruppenüberlebenszeit der ersten 9 Tage p. i. ließen sich folgende Wirkungsindizes errechnen: Wirkungsindex $W = 56,0$;
 $W_d = 61,3$; $W_g = 58,6$

Gegenüber der Kontrollgruppe unterschied sich der Wirkungsindex der Gruppe G_4 mit $p < 0,0005$ hochsignifikant.

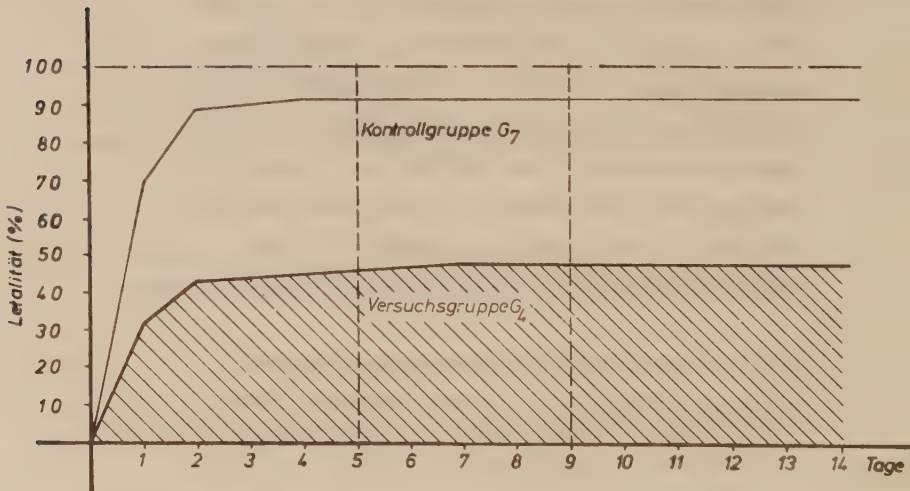


Abb. 8: Anstieg der Letalität der Gruppe G_4 nach intraperitonealer Kontrollinfektion in Relation zur Zeit (in Tagen).

VERSUCHSGRUPPE G₅:

Die Tiere der Versuchsgruppe G₅ wurden einmal mit dem Impfstoff V₂ (10⁹ lebende Keime, zweimal gewaschen und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendiert) über eine Magensonde enteral vacciniert. Die intraperitoneale Keimexposition erfolgte am 23. Tag nach der einmaligen Impfstoffapplikation (siehe auch Abb. 1, Kap. B - 2).

Die Ausgangstierzahl vor der intraperitonealen Keimexposition betrug $n = 12 \pm 100\%$. Anhand der Abb. 9 kann man die Letalität der Gruppe G₅ im Verlauf der ersten 14 Tage p. i. verfolgen. Am ersten Tag p. i. kamen 8 Tiere ad exitum; dies entspricht einer Letalität von 66,7 %. Alle anderen Tiere überlebten den weiteren Beobachtungszeitraum. Bis einschließlich den 5. Tag p. i. fand sich bei der Gruppe G₅ eine Letalität von $L = 66,7\%$.

Aus der Berechnung der durchschnittlichen Gruppenüberlebenszeit der ersten 9 Tage p. i. ergab sich ein Mittelwert von $\bar{x} = 3,67$ d; $s_x = \pm 3,94$; $s_{\bar{x}} = \pm 1,14$.

Gegenüber der Kontrollgruppe unterschied sich der Wirkungsindex W der Gruppe G_5 mit $p < 0,05$ nicht signifikant.

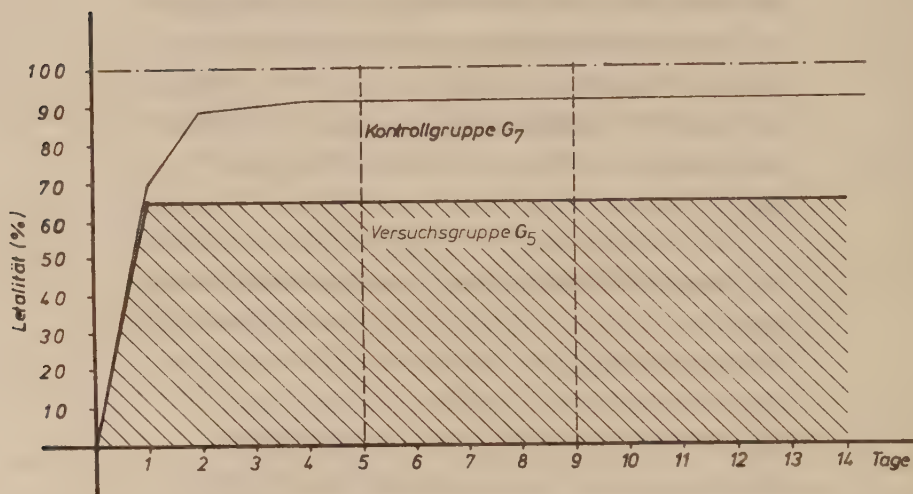


Abb. 9: Anstieg der Letalität der Gruppe G_5 nach intraperitonealer Kontrollinfektion in Relation zur Zeit (in Tagen).

VERSUCHSGRUPPE G_6 :

Die Tiere der Versuchsgruppe G_6 wurden zweimal, im Abstand von einer Woche, mit der Vaccine V_3 (10^9 hit-

zeinaktivierte, zweimal gewaschene und in 0,9%-iger Kochsalzlösung suspendierte Keime) subcutan immunisiert. Die intraperitoneale Keimexposition erfolgte am 23. Tag nach der ersten Impfstoffapplikation (siehe auch Abb. 1, Kap. B - 2).

Die Ausgangstierzahl vor der intraperitonealen Keimexposition betrug $n = 30 \hat{=} 100\%$. Die Abb. 10 zeigt den Verlauf der Letalität p. i. während der ersten 14 Tage. Am ersten Tag starben 5 Tiere; dies entspricht einer Letalität von 16,7 %. Am zweiten Tag starben 5 weitere Tiere. Während des anschließenden Beobachtungszeitraumes bis zum 14. Tag p. i. kam

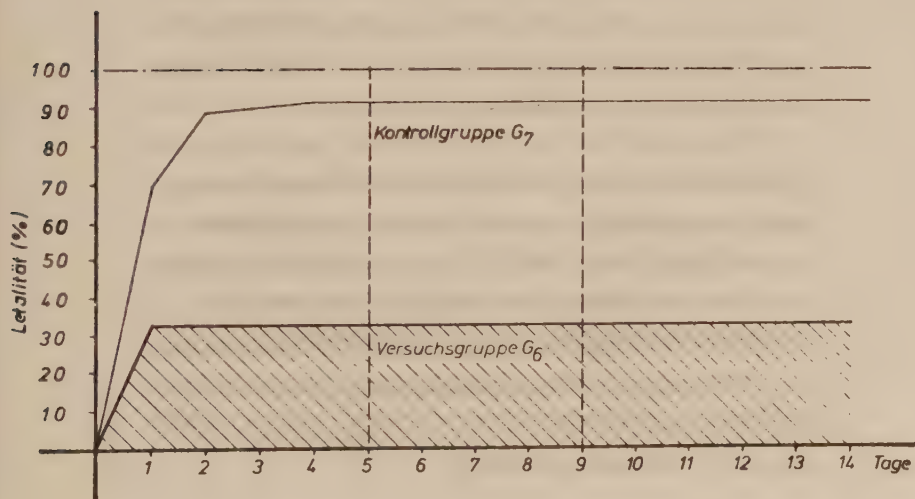


Abb. 10: Anstieg der Letalität der Gruppe G₆ nach intraperitonealer Kontrollinfektion in Relation zur Zeit (in Tagen).

kein weiteres Tier mehr ad exitum. Bis einschließlich den 5. Tag p. i. betrug die Letalität der Gruppe G_6 $L = 33,3 \%$.

Die Berechnung der durchschnittlichen Überlebenszeit der Gruppe G_6 ergab einen Mittelwert von $\bar{x} = 7,00$ d; $s_x = +3,35$; $s_{\bar{x}} = +0,67$.

Gegenüber der Kontrollgruppe unterschied sich der Wirkungsindex W der Gruppe G_5 mit $p < 0,0005$ hochsignifikant.

Beim Vergleich der Wirkungsindizes der Gruppen $G_1 - G_4$, die mit den verschiedenen Impfstoffzubereitungen vacciniert worden waren, fand sich untereinander kein signifikanter Unterschied, ebenso beim Vergleich dieser Gruppen mit der Gruppe G_6 .

Vergleicht man die verschiedenen Versuchsgruppen sowohl untereinander wie auch mit der Kontrollgruppe, so stellt man fest, daß die mit Lebendvaccine geimpften Tiere bei fast gleichwertigen Ergebnissen der Gruppen G_1 und G_2 den höchsten Wirkungsindex aufweisen. Gegenüber der Kontrollgruppe unterschied sich der Wirkungsindex der Gruppe G_1 und G_2 mit $p < 0,0005$ (t-Test) als hochsignifikant.

Bei den Gruppen G_3 und G_6 , die mit der Vaccine V_3 immunisiert wurden, zeigt sich mit $W_g = 69,7$ (G_3) und $W_g = 69,4$ (G_6) praktisch ein gleicher Wirkungsindex, d.h. daß nach oraler wie nach parenteraler Immunisierung mit der Vaccine V_3 ein gleichwertiger Impfschutz erzielt werden kann.

Gegenüber der Lebendvaccine V_2 zeigte die hitzeinaktivierte Vaccine V_3 , bei oraler Applikation, eine Wirksamkeit von 87,7 %. Dies entspricht einem sehr geringen immunogenen Wirkungsverlust der Vaccine durch Hitzeinaktivierung.

Für eine Weiterentwicklung dieses Impfstoffes für den humanmedizinischen Bereich, wo sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine orale Immunisierung mit lebenden pathogenen Keimen verbietet, ist die hohe Wirksamkeit des inaktivierten Impfstoffes von großer praktischer Bedeutung, da noch nicht nachgewiesen wurde, daß mit einem apathogenen aeruginosa-Keim ein Impfschutz erzielt werden kann. Allerdings muß hinzugefügt werden, daß sich tierexperimentelle Untersuchungsergebnisse nicht ohne Einschränkung in den humanmedizinischen Bereich übertragen lassen.

Die Tiere der Gruppe G₄ wurden 10 mal mit korpuskelfreiem hitzeinaktiviertem Wachstumsmedium oral immunisiert. Mit einem Wirkungsindex von W = 56,0 konnte ebenfalls ein signifikanter Impfschutz im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden.

Ausgehend von der Vorstellung, daß sich einmal in den Darmtrakt applizierte lebende Keime dort vermehren und möglicherweise längere Zeit persistieren, wurde der Gruppe G₅ einmal peroral die Lebendvaccine V₂ appliziert. Ein vergleichbarer signifikanter Impfschutz, wie nach mehrmaliger oraler Vaccination, konnte dabei nicht erzielt werden.

Wie die Ergebnisse zeigen, kann nach mehrmaliger oraler Vaccination, sowohl mit hitzeinaktivierter wie auch mit Lebendvaccine, ein ausgezeichneter Impfschutz gegen eine nachfolgende Infektion mit homologen Erregern von *Ps. aeruginosa* gewährleistet werden.

Bei den subcutan vaccinierten Tieren zeigten sich an den Injectionsstellen Rötung und Knötchen bis Kirschkorngroße, die nach längerem Bestehen zur Ulceration neigten. Diese lokalen Nebenwirkungen

traten bei allen s. c. vaccinierten Tieren auf. Bei den oral vaccinierten Tieren konnten bei sachgemäßer Impfstoffapplikation keine Nebenwirkungen beobachtet werden.

Die Tabelle 1 der folgenden Seite zeigt eine zusammenfassende Übersicht der Wirkungsindizes W , W_d und W_g sowie der Letalität L (%) und des statistisch ermittelten Mittelwertes $\bar{x}$ der Gruppenüberlebenszeit der ersten neun Tage p. i. der einzelnen Gruppen.

Tabelle 1:

Vergleichende Übersicht der Wirkungsindizes der Versuchsgruppen G_1 bis G_7 nach oraler bzw. parenteraler Vaccination mit *Ps. aeruginosa*-Vaccine.

Wirkungsindex W : Dieser Wirkungsindex errechnet sich aus der Letalität am Ende des 5. Tages nach i.p. Keimexposition (s. S. 35).

Wirkungsindex W_d : Wirkungsindex, der aus der durchschnittlichen Überlebenszeit der entsprechenden Versuchsgruppe der ersten neun Tage nach i.p. Keimexposition ermittelt wurde (s. S. 37).

Wirkungsindex W_g : Arithmetischer Mittelwert aus W und W_d (s. S. 37).

Letalität L_G : Letalität der jeweiligen Versuchsgruppe am Ende des 5. Tages nach i.p. Keimexposition (s. S. 43).

$\bar{x}_G$: Mittelwert der Überlebenszeit (in Tagen) der jeweiligen Versuchsgruppe der ersten neun Tage nach i.p. Keimexposition.

Gruppe	Vaccine	Wirkungs- index W	Wirkungs- index W_d	Wirkungs- index W_g	Letali- tät L_G	$\bar{x}_G$ -Tage (d)
G_1	Vacc. V_1 oral $10^1 d$	78,3	80,7	79,5	11,7 %	7,26 d
G_2	Vacc. V_2 oral $10^2 d$	76,0	77,8	76,9	14,0 %	7,00 d
G_3	Vacc. V_3 oral $10^3 d$	68,2	71,7	69,7	31,8 %	6,45 d
G_4	Vacc. V_4 oral $10^4 d$	56,0	61,3	58,6	44,0 %	5,52 d
G_5	Vacc. V_2 oral $1^2 d$	33,3	40,8	37,0	66,7 %	3,67 d
G_6	Vacc. V_3 s. c. $2^3 x$	66,7	72,2	69,4	33,3 %	6,50 d
G_7	keine Vaccine	7,7	21,3	14,5	92,3 %	1,92 d

2. ERGEBNISSE DER BAKTERIENAGGLUTINATION

Mittels der WIDAL-Reaktion wurden die postvaccinell gewonnenen Sera auf spezifische Soma-Agglutinine von *Ps. aeruginosa* untersucht. Es wurde nur eine Soma-O-Agglutination durchgeführt, da bei den hitzeinaktivierten Impfstoffen die H-Antigene durch den Inaktivierungsprozeß bereits zerstört worden waren und deswegen die Bildung von H-Agglutininen im Serum der Versuchstiere nicht zu erwarten war.

Zur Herstellung der O-Agglutinine wurde der gleiche Keim wie zur Vaccineherstellung verwendet.

Zur Messung der Titerhöhe wurde von jedem einzelnen Serum eine halbwertige Verdünnungsreihe hergestellt. Der Titerbeginn lag bei $1 : 4 \hat{=} -1b2$. Die Titerstufen wurden aus rechnerischen Gründen im negativen binären Logarithmus angegeben.

Vier Tage vor Beginn der Vaccination wurde von jeweils drei Tieren aus jedem Käfig ein Kontrollserum gewonnen. Die von diesen Sera ermittelten Titer dienten als Vergleichsbasis zur Messung des Titeranstieges nach der Vaccination. Insgesamt wurden 42 Kontroll-

Sera gewonnen, wobei bei keinem dieser Sera bei einem Titer von 1 : 4 oder bei höherer Verdünnung eine Agglutinationsreaktion gefunden werden konnte.

Aufgrund der angewandten Tests kann geschlossen werden, daß vor der Vaccination keines der untersuchten Tiere immunogenen Kontakt mit *Ps. aeruginosa* gehabt hatte.

Wie bei der vorausgehenden Untersuchung, der Messung der Letalität nach i. p. Kontrollinfektion, wird auch hier, aus Gründen der besseren Vergleichsmöglichkeit, das Ergebnis der Kontrollgruppe G_k vor den Ergebnissen der unterschiedlich vaccinierten Gruppen dargestellt. Weiterhin muß hinzugefügt werden, daß bei der serologischen Untersuchung die Kontrollgruppe G_k nicht der Versuchsgruppe G_7 entspricht, sondern diese Sera nach den Kriterien einer randomisierten Studie von den Tieren der einzelnen Käfige in oben beschriebener Weise vor Beginn der Vaccination gewonnen wurden.

KONTROLLGRUPPE G_k :

Anzahl der untersuchten Sera $n = 42$

Mittelwert der Titerstufen: $-lb \bar{x} = 0,00$; $s_x = 0,00$;

$s_x^- = 0,00$

Keines der 42 Sera zeigte, selbst bei der niedrigsten Titerstufe von 1 : 4, einen positiven Ausfall einer Agglutinationsreaktion.

VERSUCHSGRUPPE G_1 :

Orale Vaccination mit Lebendvaccine V_1 .

Anzahl der untersuchten Sera $n = 20$

Mittelwert der Titerstufen in $-lb \bar{x} = 2,30$; $s_x = +2,05$;

$s_x^- = +0,46$

Acht Sera zeigten selbst bei der niedrigsten Titerstufe von $-lb 2$ keine Agglutinationsreaktion, sechs Sera zeigten einen Titer von $-lb 3$, zwei Sera von $-lb = 4$ und vier Sera von $-lb = 5$.

Der statistische Mittelwert der Agglutinationsreaktionen der Gruppe G_1 unterschied sich bei $-lb \bar{x} = 2,3$ mit $p < 0,0005$ gegenüber G_k hochsignifikant.

VERSUCHSGRUPPE G₂:

Orale Vaccination mit Lebendvaccine V₂.

Anzahl der untersuchten Sera n = 18

Mittelwert der Titerstufen in $-lb \bar{x} = 2,72$; $s_x = \pm 1,84$;

$s_{\bar{x}} = \pm 0,43$

Fünf Sera zeigten selbst bei der niedrigsten Titerstufe von $-lb = 2$ keine Agglutinationsreaktion, fünf Sera zeigten einen Titer von $-lb = 3$, sechs von $-lb = 4$ und zwei von $-lb = 5$.

Der statistische Mittelwert der Agglutinationsreaktion der Gruppe G₂ unterschied sich bei $-lb \bar{x} = 2,72$ mit $p < 0,0005$ gegenüber der Kontrollgruppe hochsignifikant.

VERSUCHSGRUPPE G₃:

Orale Vaccination mit hitzeinaktivierter Vaccine V₃.

Anzahl der untersuchten Sera n = 17

Mittelwert der Titerstufen in $-lb \bar{x} = 1,35$; $s_x = \pm 1,93$;

$s_{\bar{x}} = 0,47$

Elf Sera zeigten selbst bei der niedrigsten Titerstufe von $-lb = 2$ keine Agglutinationsreaktion, zwei Sera zeigten einen Titer von $-lb = 3$, drei von $-lb = 4$ und eines von $-lb = 5$.

Der statistische Mittelwert der Agglutinationsreaktion der Gruppe G₃ unterschied sich bei $-lb \bar{x} = 1,35$ mit $p < 0,005$ gegenüber G_k signifikant.

VERSUCHSGRUPPE G₄:

Orale Vaccination mit Vaccine V₄ (korpuskelfreie Nährbouillon).

Anzahl der untersuchten Sera n = 17

Mittelwert der Titerstufen in -lb $\bar{x} = 2,47$; $s_x = \pm 2,00$;

$s_{\bar{x}} = \pm 0,49$

Sechs Sera zeigten selbst bei der niedrigsten Titerstufe von -lb = 2 keine Agglutinationsreaktion, fünf Sera zeigten einen Titer von -lb = 3, drei von -lb = 4 und drei von -lb = 5.

Der statistische Mittelwert der Agglutinationsreaktion der Gruppe G₄ unterschied sich bei -lb $\bar{x} = 2,47$ mit $p < 0,0005$ gegenüber G_k hochsignifikant.

VERSUCHSGRUPPE G₅:

Einmalig orale Vaccination mit Lebendvaccine V₂.

Anzahl der untersuchten Sera n = 12

Mittelwert der Titerstufen in -lb $\bar{x} = 1,35$; $s_x = \pm 1,69$;

$s_{\bar{x}} = \pm 0,41$

Acht Sera zeigten selbst bei der niedrigsten Titerstufe von -lb = 2 keine Agglutinationsreaktion, drei Sera zeigten einen Titer von -lb = 3 und ein Serum von -lb = 4.

Der statistische Mittelwert der Agglutinationsreaktion der Gruppe G_5 unterschied sich bei $-lb \bar{x} = 1,35$ mit $p < 0,005$ gegenüber G_k signifikant.

VERSUCHSGRUPPE G_6 :

Subcutane Vaccination mit hitzeinaktivierter Vaccine V_3 .

Anzahl der untersuchten Sera $n = 25$

Mittelwert der Titerstufen in $-lb \bar{x} = 5,11$; $s_x = \pm 0,63$;

$s_{\bar{x}} = \pm 0,12$

Nach der subcutanen Vaccination zeigte sich konstant eine Agglutinationsreaktion, zwei Sera zeigten einen Titer von $-lb = 4$, zwanzig von $-lb = 5$ und drei von $-lb = 6$.

Der statistische Mittelwert der Agglutinationsreaktion der Gruppe G_6 unterschied sich bei einem Titer von $-lb = 5,11$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $p < 0,0005$ hochsignifikant.

Wie bereits erwähnt, fand sich bei keinem Serum der Tiere der Kontrollgruppe, selbst bei der niedrigsten Serumverdünnung von $-lb = 2$, ein Agglutinationstiter gegen *Ps. aeruginosa*.

Innerhalb der einzelnen Gruppen der oral vaccinierten Tiere zeigte sich ein relativ inkonstanter Titeranstieg. Die durchschnittlichen Agglutinationstiter der oral vaccinierten Tiergruppen lagen mit Titeranstiegen zwischen $-lb = 1,35$ und $-lb = 2,72$, insbesondere im Vergleich zur subcutan vaccinierten Gruppe G_6 mit einem Titeranstieg von $-lb \bar{x} = 5,11$, relativ niedrig.

Aufgrund der Tatsache, daß keines der Tiere der Kontrollgruppe bei der niedrigsten Serumverdünnung einen Agglutinationstiter aufwies, waren bei der statistischen Auswertung die Ergebnisse aller vaccinierten Gruppen $G_1 - G_6$ gegenüber G_k statistisch gesehen signifikant.

3. ERGEBNISSE DER BESTIMMUNG DER GAMMAGLOBULINE, DER
IMMUNGLOBULINFRAKTIONEN IgG, IgM SOWIE DER KOMPLE-
MENTFRAKTION C₃

Die radiale Immundiffusion (RID) beruht auf einer Diffusion des zu untersuchenden antigenhaltigen Serums in einer Antikörper enthaltenden Agarosegel-Platte. Im Agarosegel findet eine Antigen-Antikörper-Präzipitationsreaktion statt. Nach Beendigung der Diffusion ist die Fläche des entstandenen Präzipitatrings der Antigenmenge des aufgetragenen Serums proportional.

Mit dieser Untersuchungsmethode wurden die Sera der Versuchstiere auf die vorhandene Menge an Gesamtimmunglobulin, der Immunglobulinfraktionen IgG und IgM sowie auf den Komplementfaktor C₃ untersucht.

Da für die zu untersuchenden Meerschweinchenproteine weder standardisierte Sera noch Antisera zur Verfügung standen, konnten nur Vergleichsmessungen durchgeführt werden. Dabei wurden die nach der Vaccination von den Versuchstieren gewonnenen Sera mit den Sera

der Kontrollgruppe G_k verglichen. Die Ergebnisse wurden entsprechend der Größe der Flächen der Präzipitatringe in " mm^2 " angegeben.

Abgesehen von der Aussage, in wie weit sich die zu untersuchenden Proteinfractionen im Normbereich bewegten, hätte eine Standardisierung und Umrechnung der Werte in Internationale Einheiten keine zusätzliche Aussage gebracht.

Die Ergebnisse der RID der Gesamtimoglobuline, der Globulinfractionen IgG und IgM sowie der Komplementfraktion C_3 sind in den Tabellen (Tab. 2 - 5) dargestellt. Aus Gründen der besseren Vergleichsmöglichkeit werden die Ergebnisse der Kontrollgruppe vor den Ergebnissen der unterschiedlich vaccinierten Versuchsgruppen aufgeführt. Neben den durchschnittlichen Präzipitatflächen der einzelnen Versuchsgruppen wurden die Flächenunterschiede der Versuchsgruppen zur Kontrollgruppe prozentual angegeben. In der letzten Spalte wurde der statistische Vergleich (t-Test) der einzelnen Gruppen mit der Kontrollgruppe G_k in Form von "p", der prozentualen Irrtumswahrscheinlichkeit, dargestellt.

Tabelle 2:

Ergebnisse der Bestimmung der Gesamtimmunglobuline mittels der RID.

$\bar{x}$: Mittelwert der gemessenen Präzipitatflächen der entsprechenden Versuchsgruppe. s_x : Standardabweichung. $s_{\bar{x}}$: Mittlerer Fehler des Mittelwertes. G_k : Kontrollgruppe. G_x : Jeweilige Versuchsgruppe. p : Irrtumswahrscheinlichkeit.

Von der Gruppe G_6 konnten nur drei Ergebnisse verwertet werden (78,2 mm²; 79,9 mm²; 89,8 mm²). Auf eine Ermittlung des Mittelwertes wurde deshalb bei G_6 verzichtet.

Gruppe	Vaccine	Mittelwert $\bar{x}$ d. Präzipitatfl.	s_x	$s_{\bar{x}}$	$\frac{G_x}{G_k} \times 100$	$p (G_x : G_k)$
G_k	keine Vaccine	52,98 mm ²	$\pm 15,80$	$\pm 2,50$		
G_1	Vacc. V_1 oral 10 ¹ d	71,66 mm ²	$\pm 8,96$	$\pm 2,70$	135,26%	<0,0005
G_2	Vacc. V_2 oral 10 ² d	74,00 mm ²	$\pm 6,20$	$\pm 1,96$	139,68%	<0,0005
G_3	Vacc. V_3 oral 10 ³ d	76,98 mm ²	$\pm 12,91$	$\pm 3,45$	145,30%	<0,0005
G_4	Vacc. V_4 oral 10 ⁴ d	77,56 mm ²	$\pm 13,98$	$\pm 4,42$	146,40%	<0,0005
G_5	Vacc. V_5	74,53 mm ²	$\pm 11,94$	$\pm 4,88$	140,68	<0,0005

Tabelle 3:

Ergebnisse der Bestimmung der Immunglobulinfraktion IgG mittels RID.

$\bar{x}$: Mittelwert der gemessenen Präzipitatflächen der entsprechenden Versuchsgruppe. s_x : Standardabweichung. $s_{\bar{x}}$: Mittlerer Fehler des Mittelwertes. G_k : Kontrollgruppe. G_x : Jeweilige Versuchsgruppe. p : Irrtumswahrscheinlichkeit.

Gruppe	Vaccine	Mittelwert $\bar{x}$ d. Präzipitatfl.	s_x	$s_{\bar{x}}$	$\frac{G_x}{G_k} \times 100$	$p (G_x : G_k)$
G_k	keine Vaccine	33,75 mm ²	$\pm 9,69$	$\pm 1,53$		
G_1	Vacc. V ₁ oral 10 ¹ d	56,81 mm ²	$\pm 11,24$	$\pm 2,73$	168,32%	<0,0005
G_2	Vacc. V ₂ oral 10 ² d	54,54 mm ²	$\pm 6,76$	$\pm 1,69$	161,60%	<0,0005
G_3	Vacc. V ₃ oral 10 ³ d	64,07 mm ²	$\pm 16,37$	$\pm 3,86$	189,84%	<0,0005
G_4	Vacc. V ₄ oral 10 ⁴ d	58,29 mm ²	$\pm 14,00$	$\pm 3,40$	172,71%	<0,0005
G_5	Vacc. V ₂ oral 1 ² d	53,04 mm ²	$\pm 10,66$	$\pm 2,59$	157,61%	<0,0005
G_6	Vacc. V ₃	43,98 mm ²	$\pm 6,26$	$\pm 3,40$	130,31%	<0,0005

Tabelle 4:

Ergebnisse der Bestimmung der Immunglobulinfraktion IgM mittels RID.

$\bar{x}$: Mittelwert der gemessenen Präzipitatflächen der entsprechenden Versuchsgruppe. s_x : Standardabweichung. $s_{\bar{x}}$: Mittlerer Fehler des Mittelwertes. G_k : Kontrollgruppe. G_x : Jeweilige Versuchsgruppe.
p: Irrtumswahrscheinlichkeit.

Gruppe	Vaccine	Mittelwert $\bar{x}$ d. Präzipitatfl.	s_x	$s_{\bar{x}}$	$\frac{G_x}{G_k} \times 100$	p ($G_x: G_k$)
G_k	keine Vaccine	4,02 mm ²	$\pm 0,76$	$\pm 0,12$		
G_1	Vacc. V ₁ oral 10 ¹ d	5,75 mm ²	$\pm 1,05$	$\pm 0,26$	143,03%	<0,0005
G_2	Vacc. V ₂ ¹ oral 10 ² d	5,92 mm ²	$\pm 1,18$	$\pm 0,29$	147,26%	<0,0005
G_3	Vacc. V ₃ oral 10 ³ d	6,38 mm ²	$\pm 1,79$	$\pm 0,43$	158,71%	<0,0005
G_4	Vacc. V ₄ oral 10 ⁴ d	7,04 mm ²	$\pm 1,64$	$\pm 0,40$	175,12%	<0,0005
G_5	Vacc. V ₂ oral 1 ² d	6,19 mm ²	$\pm 1,30$	$\pm 0,31$	171,74%	<0,0005
G_6	Vacc. V ₃ s.c. 2x	6,44 mm ²	$\pm 1,04$	$\pm 0,25$	160,20%	<0,0005

Tabelle 5:

Ergebnisse der Bestimmung der Komplementfraktion C_3 mittels RID.

$\bar{x}$: Mittelwert der gemessenen Präzipitatflächen der entsprechenden Versuchsgruppe. s_x : Standardabweichung. $s_{\bar{x}}$: Mittlerer Fehler des Mittelwertes. G_k : Kontrollgruppe. G_x : Jeweilige Versuchsgruppe. p : Irrtumswahrscheinlichkeit.

Von der Gruppe G_6 konnten nur drei Ergebnisse ermittelt werden, deswegen wurde auf eine Mittelwertsbestimmung verzichtet. Die Werte lagen jedoch ebenfalls deutlich über dem statistischen Mittelwert der Kontrollgruppe G_k .

Gruppe	Vaccine	Mittelwert $\bar{x}$	s_x	$s_{\bar{x}}$	$\frac{G_x}{G_k} \times 100$	$p (G_x : G_k)$
G_k	keine Vaccine	35,28 mm ²	$\pm 8,72$	$\pm 1,38$		
G_1	Vacc. V ₁ oral 10 ¹ d	41,85 mm ²	$\pm 4,06$	$\pm 1,28$	118,62%	<0,0025
G_2	Vacc. V ₂ oral 10 ² d	43,43 mm ²	$\pm 6,15$	$\pm 1,95$	123,10%	<0,0025
G_3	Vacc. V ₃ oral 10 ³ d	41,64 mm ²	$\pm 3,68$	$\pm 0,98$	118,03%	<0,0025
G_4	Vacc. V ₄ oral 10 ⁴ d	47,95 mm ²	$\pm 6,84$	$\pm 2,16$	135,91%	<0,0025
G_5	Vacc. V ₂ oral 1 ² d	40,11 mm ²	$\pm 4,06$	$\pm 1,66$	113,69%	<0,025

Nach der oralen Vaccination kam es sowohl bei den Gesamtimmunglobulinen, bei den IgG- und IgM-Immunglobulinfractionen wie auch bei der quantitativen Untersuchung der Komplementfraktion C_3 zu einem signifikanten Anstieg der Werte gegenüber der Kontrollgruppe G_k .

Bei den Gesamtimmunglobulinen fand sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nach oraler Vaccination ein Anstieg zwischen 35,3 % (G_1) und 46,4 % (G_4). Eine direkte Beziehung zwischen der Zunahme der Immunglobuline und dem Wirkungsindex konnte mittels einer Korrelation und der Berechnung des Regressionskoeffizienten nicht gefunden werden.

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei den Untersuchungen der Immunglobulinfraction IgG. Überraschenderweise fand sich nach subcutaner Vaccination mit der Vaccine V_3 ein deutlich geringerer Anstieg von IgG als nach oraler Vaccination (nach s.c. Vacc. IgG-Anstieg auf 130,3 % gegenüber 189,8 % nach oraler Vacc.). Der Wirkungsindex W_g der beiden Gruppen war mit $W_g = 69,7$ (G_3) zu $W_g = 69,4$ (G_6) hingegen praktisch gleich. Ebenso wie bei den Gesamtimmunglobulinen

konnte auch bei der IgG-Fraktion keine eindeutige Beziehung zwischen der Zunahme der Immunglobulinfraktion und dem Wirkungsindex der einzelnen Gruppen gefunden werden.

Die Veränderungen der IgM-Immunglobuline nach Kontakt mit bakteriellen Antigenen bzw. Immunogenen werden in der Literatur allgemein als eine sog. Sofortreaktion beschrieben (95), im Gegensatz zum verzögerten Auftreten von IgG. Nach Antigenkontakt kommt es nach etwa zwei bis sieben Tagen zu einer vermehrten IgM-Synthese, die sich ohne weitere Antigengaben nach ca. drei Wochen wieder rückläufig verhält (65).

Bei der vorliegenden Studie wurden die zu untersuchenden Sera am 17. Tag nach Vaccinationsbeginn gewonnen. Je nach Vaccine wurden unterschiedliche IgM-Anstiege ermittelt, wobei wiederum keine eindeutige Beziehung zwischen IgM-Anstieg und Wirkungsindex gefunden werden konnte. Allerdings zeigte sich nach oraler und nach parenteraler Vaccination mit V_3 bei den entsprechenden Versuchsgruppen ein annähernd gleicher Anstieg von IgM (nach oraler Immunisierung von G_3 mit V_3 auf 158,7 % und nach s.c. Immunisierung von G_6 mit V_3 auf 160,2 %).

Auffallend ist außerdem, daß nach oraler Vaccination mit hitzeinaktivierter Vaccine höhere Anstiege der IgG-, IgM- sowie Gesamtgammaglobulinwerte nachgewiesen werden konnten als nach oraler Immunisierung mit Lebendvaccine. Bei der Bestimmung der Wirkungsindizes der einzelnen Vaccinen verhielten sich die ermittelten Ergebnisse genau umgekehrt.

Bei der Immunabwehr des Organismus ist das Komplementsystem an den verschiedensten Abwehrvorgängen beteiligt. So spielen die verschiedenen Komplementfraktionen bei der Chemotaxis, der Phagozytose wie auch bei der Bakterizidie eine bedeutende Rolle. Um einen eventuellen Einfluß der oralen Vaccination auf das Komplementsystem erfassen zu können, wurde der Komplementfaktor C_3 bestimmt. Da der Nachweis auf immunchemischem Weg erfolgte (RID nach MANCINI (89)), wurde allerdings nicht die C_3 -Aktivität, sondern der quantitative C_3 -Serumspiegel gemessen. Aus der Höhe des Serumspiegels der C_3 -Komplementkomponente läßt sich jedoch nicht direkt auf eine Aktivierung der Komplementkaskade schließen (117). Im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen Zunahme der Antigen-Antikörperkomplexe

kann eine Zunahme der C_3 -Komponente jedoch ebenfalls als Hinweis für eine Aktivierung der antibakteriellen Immunabwehr angesehen werden.

Beim Vergleich der Versuchsgruppen G_1 bis G_4 mit der Kontrollgruppe G_k ergab sich nach Vaccination ein signifikanter Anstieg ($p < 0,0025$). Das Ergebnis der Gruppe G_5 erwies sich mit $p < 0,025$ nicht als signifikant.

D) DISKUSSION

1. PROBLEM DER PS. AERUGINOSA-INFEKTIONEN

Ps. aeruginosa ist ein in der Natur ubiquitär vorkommender Keim. Es handelt sich um einen typischen Naßkeim, der physiologisch sehr anpassungsfähig ist. Beim gesunden Menschen kann *Ps. aeruginosa* nur in geringer Zahl isoliert werden. Seine Isolierung gelingt jedoch vermehrt bei hospitalisierten sowie bei antibiotisch vorbehandelten Patienten.

Im Klinikbereich kann man *Ps. aeruginosa* sehr häufig und an verschiedensten Stellen isolieren, z. B. an Wasserhähnen, Badewannen, Stationsutensilien, Kochsalzlösungen, Fußböden usw. Selbst aus einigen gebräuchlichen Desinfektionsmittellösungen konnte eine Kontamination mit *Ps. aeruginosa* nachgewiesen werden (1; 49; 80).

Bei *Ps. aeruginosa* handelt es sich um einen fakultativ pathogenen Erreger (109). Patienten mit intaktem Immunsystem und bei gutem körperlichen Allgemeinzustand erkranken nur selten an *Ps. aeruginosa*-Infektionen. Zu

den infektionsgefährdeten Patientengruppen gehören neben Kleinkindern und sehr alten Menschen vorwiegend Patienten, die sich in reduziertem Allgemeinzustand befinden, an einer Schwäche oder Erkrankung des Immunsystems leiden oder ein schweres Trauma erlitten haben.

Häufig kann *Ps. aeruginosa* als Krankheitserreger bei Patienten mit schweren Verbrennungen isoliert werden (3; 4; 5; 6; 87; 101; 102; 119). Nach Untersuchungen von BENNET (22) werden bei Patienten mit Verbrennungen ca. 25 % aller Infektionen durch *Ps. aeruginosa* verursacht.

Weitere Patientengruppen, bei denen sich gehäuft *Ps. aeruginosa*-Infektionen finden, sind Patienten mit malignen Erkrankungen, Patienten, die unter einer Medikation mit Zytostatika oder Immunsuppressiva stehen (48) sowie Patienten mit Agranulozytose (136); also in erster Linie Patienten, deren Abwehrkräfte entweder durch zehrende oder das Immunsystem beeinträchtigende Erkrankungen oder durch immunsuppressive Medikation geschwächt wurden.

Bei Patienten mit Cystischer Fibrose konnte *Ps. aeruginosa* als häufigster Erreger bei Infektionen der

Lungen und der Atemwege isoliert werden. Die Häufigkeit lag bei den Untersuchungsergebnissen zwischen 70 % (41) und 77 % (94).

In zunehmenden Maße findet sich *Ps. aeruginosa* Infektionserreger bei Patienten mit chronischer posttraumatischer bzw. postoperativer Osteomyelitis (13; 32; 92; 100; 121; 128). Untersuchungen von PLAUE und HINZ (100), die die Keimflora aller Osteomyelitispatienten der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg-Schlierbach über einen Zeitraum von 15 Jahren aufschlüsselten, ergaben eine Zunahme von *Ps. aeruginosa* von 13,2 % des Erregerspektrums vom Jahre 1954 auf 43,5 % im Jahre 1968. Der Keim konnte dabei sowohl von Mono- wie auch von Mischkulturen isoliert werden. RING et al (108) fanden bei ihren Untersuchungen zur chronischen posttraumatischen Osteomyelitis, sowohl in Mono- wie auch in Mischkulturen, *Ps. aeruginosa* als zweithäufigsten Erreger. URBACH (128) konnte bei ihren Untersuchungen bei Osteomyelitispatienten der Unfallklinik Murnau in den Jahren 1975/76 mit 15,4 % *Ps. aeruginosa* nach *Staph. aureus* (45,2 %) ebenfalls als zweithäufigsten Erreger isolieren.

Man kann fast sagen, daß die Zunahme nosocomialer Infektionen mit einer Zunahme von *Ps. aeruginosa*-Infek-

tionen parallel geht, wobei die Ursache hierfür in der primären Resistenz des Keimes gegenüber den meisten Antibiotika zu sehen ist. Deshalb gewinnen *Ps. aeruginosa*-Erreger besonders in der Unfallchirurgie zunehmend an Bedeutung. Hier dürfte vermutlich das Zusammentreffen mehrerer Faktoren das Angehen einer *Ps. aeruginosa*-Infektion begünstigen. Einerseits kann es durch die Anwendung von Breitbandantibiotika zur posttraumatischen bzw. postoperativen antibiotischen Abschirmung zur Selektion und Vermehrung resistenter Erreger im Wundgebiet kommen. So hatte die Einführung und klinische Anwendung neuer Antibiotika ein vermehrtes Auftreten neuer Problemkeime zur Folge, deren Infektionsrisiko bis zu diesem Zeitpunkt von untergeordneter Bedeutung war (3). Andererseits leiden die meisten polytraumatisierten Patienten sowie Patienten mit schweren Verbrennungen wenigstens vorübergehend unter einer lokalen oder systemischen Abwehrschwäche und sind deswegen für Infektionen sehr anfällig. Die Kontamination kann dabei sowohl auf dem Luftweg wie auch durch direkten Kontakt erfolgen, wobei die Übertragung und Verbreitung insbesondere von sog. Hospitalismuskkeimen leider häufig iatrogen erfolgt, z. B. durch die Hände des Klinikpersonals.

Eine manifeste Infektion mit *Ps. aeruginosa* stellt für Patienten mit vorgeschädigtem Wirtsorganismus eine ernste Gefahr dar, für den behandelnden Arzt ein therapeutisches Problem. Einerseits stehen zur Bekämpfung von *Ps. aeruginosa*-Infektionen nur eine begrenzte Anzahl wirksamer Antibiotika zur Verfügung, andererseits kann nur bei ausreichender körperlicher Abwehr eine antibiotische oder operative Therapie erfolgversprechend sein (64). Deshalb muß versucht werden, möglichst frühzeitig nach Erkennen der Situation die körpereigene Abwehr passiv, z. B. durch Immunglobuline (5; 16; 42) oder durch spezifische aktive Stimulation zu verbessern (5).

Eine inzwischen erfolgreich angewandte Therapiemöglichkeit findet sich in der parenteralen Vaccination gegen *Ps. aeruginosa* (3; 4; 5).

2. IMPFSTOFF

Die Idee einer antibakteriellen Vaccination gegen *Ps. aeruginosa* ist nicht neu. In ausführlichen Studien klinischer und experimenteller Art berichten ALEXANDER et al (3; 4; 5), ALMS and BASS (7; 8),

FELLER (44), FISHER (45; 46;), LABORDE and deFAJARDO (78), MARKLEY and SMALLMAN (90) und REYNOLDS (105; 106) von guten Ergebnissen nach einer parenteralen Immunisierung gegen *Ps. aeruginosa*. Die Impfstoffapplikation erfolgte bei diesen Studien stets parenteral, also intracutan, subcutan oder intramuskulär.

JONES (74) konnte nach parenteraler Immunisierung von Mäusen einen Anstieg spezifischer Antikörper nachweisen, die der IgM-Immunglobulinfraktion angehörten. Dabei ging er folgendermaßen vor: Er untersuchte nach einer einmaligen Injektion einer multivalenten *Ps. aeruginosa*-Vaccine die humorale Immunantwort mittels des passiven Hämagglutinations-Testes (HA-Test). Vier und sieben Tage nach der parenteralen Immunisierung wurde von den Versuchstieren Serum entnommen. Während bei keinem der nicht vaccinierten Tiere ein meßbarer HA-Titer zu verzeichnen war, fand sich bei allen immunisierten Tieren ein Titeranstieg. Die Streubreite des Antipseudomonas-Hämagglutinins reichte von 1 : 2 bis zu 1 : 1024.

Zum Nachweis, daß die gefundenen Antikörper der IgM-Immunglobulinfraktion angehören, wurde der HA-Test,

nach Inaktivierung der IgM-Immunglobuline mittels 2-Mercaptoäthanol, mit den gleichen Sera wiederholt. Da beim zweiten passiven HA-Test der Titeranstieg fehlte, konnte geschlossen werden, daß die im vorangehenden HA-Test gefundenen Antikörper der IgM-Immunglobulinfraktion zugeordnet werden konnten.

Bei weiteren Untersuchungen mit einer ein- bzw. zweimaligen Boosterinjektion fand JONES (74) entsprechend seinen Erwartungen eine intensivere Immunantwort als nach einer einmaligen Injektion des Immunogens.

ALEXANDER et al (3; 4; 5) untersuchten in mehreren Studien die immunisierende Wirkung einer heptavalenten *Ps. aeruginosa*-Vaccine bei Patienten mit schweren Verbrennungen. Die Vaccine, die aus "teilweise gereinigten Lipopolysacchariden mit viel Endotoxineffekt" bestand, genannt PSEUDOGEN (Fa. Parke-Davis), wurde parenteral verabreicht. Damit gelang es ALEXANDER et al (5), die Letalität von Patienten mit *Ps. aeruginosa*-Infektionen nach schweren Verbrennungen von 14,7 % auf 3,1 % zu senken. Das Auftreten einer *Ps. aeruginosa*-Sepsis konnte von 18,7 % auf 8,25 % reduziert werden.

Übereinstimmend mit anderen Autoren, die über parenterale Applikation antibakterieller Impfstoffe berichten, beschreiben ALEXANDER et al (5) jedoch Nebenwirkungen, deren Skala von einer harmlosen lokalen Rötung bishin zu schwersten anaphylaktischen Reaktionen reicht. Nach Angaben dieser Autoren reagierten nach parenteraler Vaccination mit PSEUDOGEN^R "nahezu 90 % der Patienten mit einer erkennbaren lokalen oder fieberigen Reaktion für kurze Zeit".

Als häufig auftretende Nebenreaktionen wurden Lokalreaktionen in Form von Rötung oder Induration an der Injektionsstelle sowie systemische Reaktionen in Form von Abgeschlagenheit oder Temperaturanstieg beobachtet. Ernstere Nebenreaktionen waren sehr selten.

Bei den eigenen Untersuchungen fand sich nach subcutaner Immunisierung der Versuchsgruppe G₆ mit der hitzeinaktivierten Vaccine V₃ bei allen Versuchstieren am Injektionsort eine Lokalreaktion in Form eines etwa kirschkerngroßen, entzündlich geröteten und im Vergleich zur Umgebung überwärmten Tumors, der zu zentraler Einschmelzung mit nachfolgender Ulceration neigte. Nach der Boosterinjektion konnte dabei allgemein eine heftigere Reaktion als nach der Erstin-

jektion registriert werden. Schwerere Nebenreaktionen im Sinne eines ausgeprägten Schüttelfrostes oder einer Schocksymptomatik wurden nicht beobachtet.

3. VACCINE UND IHRE ENTERALE APPLIKATION

Spricht man von "Vaccination", so assoziiert man diesen Terminus gewöhnlich mit einer parenteralen Impfstoffapplikation mittels einer Spritze oder einer Lanzette. Gerade in den letzten Jahren wurden jedoch andere Möglichkeiten der Impfstoffapplikation mit Erfolg angewandt. Neben der rectalen und nasalen Impfstoffapplikation gewinnt insbesondere die orale Vaccination in zunehmenden Maße an Interesse und Bedeutung. SEIFERT (113) und RING et al (107) berichten beispielsweise über ermutigende klinische Ergebnisse bei der Behandlung der chronischen posttraumatischen Osteomyelitis mittels oraler Vaccination mit hitzeinaktivierter Autovaccine. SCHLEWINSKI (111) konnte anhand vergleichender Untersuchungen über orale, rectale und nasale Vaccination mit Staph. aureus als Testkeim, in Übereinstimmung mit anderen Autoren, mittels oraler Vaccination dabei den zuverlässigsten Impfschutz erzielen.

Bei den eigenen Untersuchungen zur oralen Impfstoffapplikation wurden vier verschiedene, monovalente Impfstoffzubereitungen von *Ps. aeruginosa* verwendet.

Die Vaccine V_1 enthielt lebende *Ps. aeruginosa*-Erreger in einer Konzentration zwischen 5×10^8 und 1×10^9 Keimen pro Milliliter. Weiterhin enthielt dieser Impfstoff Stoffwechsel- und Abbauprodukte sowie bereits abgestorbene Keime und Keimfragmente von *Ps. aeruginosa* (siehe auch C - 1.6.4.).

Dieser Impfstoff enthielt prinzipiell die gleichen Substanzen wie z. B. mit *Ps. aeruginosa*-Keimen kontaminierte Nahrungsmittel, nämlich lebende und abgestorbene Erreger sowie deren Endo- und Exotoxine. Ausgehend von der Vorstellung, daß die Immunorgane des Darmtraktes in ihrer normalen Funktion eine Immunbarriere gegenüber den tagtäglich mit der Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen und deren Toxine darstellen und den Organismus sowohl lokal wie auch systemisch vor der Invasion und Intoxikation dieser Erreger schützen, wurde nach der Applikation der Vaccine V_1 , die alle potentiell immunogenen Substrate enthielt, eine optimale Immunantwort erwartet. Sowohl beim Schutzversuch wie auch bei den gemessenen Laborparametern schnitt diese Gruppe am besten ab.

Mit der Vaccine V_2 kam ein von Stoffwechsel- und Abbauprodukten gereinigter Impfstoff zur Anwendung, dessen Antigenstrukturen in keiner Weise durch eine inaktivierende Vorbehandlung denaturiert worden waren. Ein Wirkungsverlust durch Inaktivierungsvorgänge war damit auszuschließen. Dieser Impfstoff wurde als Vergleichsgrundlage bei der Bewertung der Wirksamkeit der einzelnen Vaccinen gewählt.

Wie RAETTIG et al (103) bei ihren Untersuchungen ermitteln konnten, kommt es sowohl durch chemische und thermische Inaktivierung eines Impfstoffes, wie auch durch Inaktivierung mittels ionisierender Strahlen zu einer je nach Methode unterschiedlichen Denaturierung der Antigenstrukturen. Dies bedeutet, daß bei jeder Inaktivierung eines Impfstoffes ein, je nach Methode unterschiedlich großer Wirkungsverlust in Kauf genommen werden muß.

Bei der Vaccine V_3 handelt es sich um einen Impfstoff aus Vollantigen, der durch eine Vorbehandlung thermisch inaktiviert worden war (Temp. 64°C ; Dauer 90 min).

RAETTIG et al (103) stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß die Hitzeinaktivierung von Impfstoffen

gegenüber den anderen Methoden die schonenste Methode mit dem geringsten immunogenen Wirkungsverlust darstellt.

Weiterhin konnten sie nachweisen, daß kurzzeitig, dafür aber hoch erhitzte Vollantigene gegenüber einer Inaktivierung bei geringerer Temperatur (z. B. 60°C), dafür aber längerer Inaktivierungsdauer, einen geringeren Wirkungsverlust aufwiesen. So fanden sie bei Inaktivierungsuntersuchungen an *S. typhi murium*-Bakterien, die 75 min. bei 60°C inaktiviert wurden, gegenüber der entsprechenden Lebendvaccine einen Rückgang des Wirkungsindex auf 40,3 (Wirkungsindex der Lebendvaccine = 100).

Eigene Untersuchungen an *Ps. aeruginosa*-Bakterien konnten hierzu die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um RAETTIG nicht bestätigen. So zeigte die Vaccine V₃ (hitzeinaktiviertes Vollantigen 64°C; Dauer 90 min) gegenüber der Lebendvaccine einen Wirkungsindex von 89,7.

Ähnliche Ergebnisse bei Untersuchungen über den immunogenen Wirkungsverlust nach Hitzeinaktivierung von Impfstoffen finden sich bei FONTAGES et al (47). Bei Vergleichen von Lebendvaccine mit hitzeinaktivierter Vaccine von *S. typhi murium* wurde bei der hitzein-

aktivierten Vaccine bei einer Inaktivierungsdauer von 3 Std. bei 63°C gegenüber der Lebendvaccine eine Wirksamkeit von 70 % gefunden.

Zur Herstellung der Vaccine V₄ wurde die Nährbouillon nach einer Wachstumsdauer von 48 Std. und nachfolgender Hitzeinaktivierung (64°C/90 min) durch zweimaliges Zentrifugieren (3000 UpM $\hat{=}$ 1500g) von *Ps. aeruginosa*-Keimen und ungelösten Korpuskeln befreit. Die als Vaccine verwendete Nährbouillon enthielt somit nur lösliche Bestandteile des zuvor darin angezüchteten Keimes. Da auf eine qualitative und quantitative Untersuchung dieser Vaccine verzichtet wurde, lassen sich jedoch nur Spekulationen über die in der Bouillon enthaltenen immunogen wirksamen Substanzen anstellen (siehe auch B - 1.6.4.).

Die Funktion des Darmtraktes als bedeutendes Immunorgan des Körpers blieb lange Zeit unerkannt oder wurde in seiner Wertigkeit unterschätzt. Deswegen wurde der enterale Immunisierung im humanmedizinischen Bereich bislang nur untergeordnete Bedeutung beigemessen. In der Veterinärmedizin hingegen findet die enterale Vaccination schon seit geraumer Zeit breitere Anwendung. Zwar kommen dort vorwiegend antivirale Lebendimpfstoffe

zur Anwendung, jedoch auf dem "14th Congress of the Association of Biological Standardization, Douglas, Isle of Man" konnte von ermutigenden Ergebnissen mehrerer antibakterieller enteral applizierter Impfstoffe berichtet werden, z. B. einer oralen *E. coli*-Vaccine gegen Enteritis bei Ferkeln oder einer *Pasteurella multocida*-Vaccine für Puten (70).

Als Hauptargument gegen eine orale Vaccination wurde bisher immer eine Strukturveränderung bzw. eine Denaturierung der Antigene mit Verlust ihrer immunogenen Wirksamkeit durch Salzsäure und Fermente im Magen angeführt. Untersuchungen von BUCHS (32) haben jedoch gezeigt, daß diese Vorstellung revisionsbedürftig ist.

BUCHS (32) konnte mit seinen Untersuchungen den Nachweis erbringen, daß höchstens 7 % - 22 % des Nahrungseiwisses während der Magenpassage durch Säure oder Fermente verändert werden. Kleinere Proteinmengen, die den Magen wieder schnell verlassen, können diesen praktisch unangedaut passieren.

Als Erklärung für die Entstehung einer generellen Immunität nach oraler Immunisierung finden sich in der Literatur zwei Theorien:

1. sog. Persorptionstheorie
2. Theorie der Stimulation der in der Tunica mucosa und insbesondere in den Peyer'schen Plaques gelegenen Lymphozyten durch Antigenkontakt.

Aus einer interessanten, von VOLKHEIMER (131) 1968 veröffentlichten Untersuchung, geht hervor, daß korpuskuläre Elemente, wie z. B. größere Stärkemoleküle, die Darmwand unverändert passieren können. Er konnte nachweisen, daß enteral verabreichte Stärkekörner intakt die Darmwand passieren können und dann sowohl über den Lymphweg wie auch über den Pfortaderkreislauf abtransportiert werden. Dieser Mechanismus einer parazellulären Aufnahme von unveränderten Partikeln durch die Darmwand in den Blutkreislauf wurde von Volkheimer als "Persorption" definiert.

Das Phänomen der Persorption wird jedoch bereits in älteren Literaturstellen beschrieben, und zwar erstmalig in einer 1844 von HERBST (63) veröffentlichten Publikation "Über das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtungen". In älteren Literaturstellen wird deswegen die Persorption als sogenannter "Herbsteffekt" bezeichnet.

Der Resorptionsmechanismus der Persorption wird dabei folgendermaßen diskutiert, daß die Partikel an der lumenwärtigen Seite der Zylinderzellen in Vacuolen eingeschlossen werden, die sich nach Durchquerung der Darmepithelzellen in abführende Blut- und Lymphgefäße entleeren.

Da sich die Größenverhältnisse von Stärkekörnern und Bakterien in ähnlichen Dimensionen bewegen, lag es, nahe Untersuchungen anzustellen, ob sich eine Persorption auch mit enteral verabreichten Bakterien nachweisen läßt.

Die Arbeitsgruppe um Raettig leistete hierzu entscheidende Beiträge. In mehreren Testmodellen mit verschiedenen Mikroorganismen und an verschiedenen Versuchstieren konnte der Nachweis erbracht werden, daß nach enteraler Applikation von Bakterien eine Persorption dieser Keime stattfindet.

Weiterhin konnte von der gleichen Arbeitsgruppe anhand einer ganzen Serie von Versuchen eine Normkurve der Persorptionskinetik von Mikroorganismen erarbeitet werden. Diese Kurve weist bei der Persorption der meisten untersuchten Mikroorganismen zwischen 30 und

60 Minuten nach oraler Applikation einen Höhepunkt auf und fällt nach ca. 8 Stunden wieder zum Nullpunkt ab (siehe Abb. 11).

SCHLEWINSKI (112) verwendete bei ihren Studien über die Persorptionskinetik von Mikroorganismen einen *Staph. aureus haemolyticus*-Stamm. Als Versuchstiere verwendete sie weiße Mäuse und weiße Ratten. Der Nachweis, daß Bakterien auf dem Weg der Persorption vom Darmtrakt in die Blutbahn gelangten, wurde durch positive Blutkulturen nach mehrmaligen Blutentnahmen aus dem Schwanz der Tiere erbracht. Anhand der ausgezählten Kolonien und dem entsprechenden Zeitabstand der Blutentnahme nach oraler Keimapplikation konnte eine Persorptionskurve erstellt werden.

GRABEN (112) arbeitete bei entsprechender Versuchsanordnung mit einer virulenten Kultur von *S. typhi murium* als Testkeim. Er konnte ebenfalls eine "Persorptionsbakteriämie" mit ähnlicher Kinetik und Persorptionskurve wie Schlewinski nachweisen.

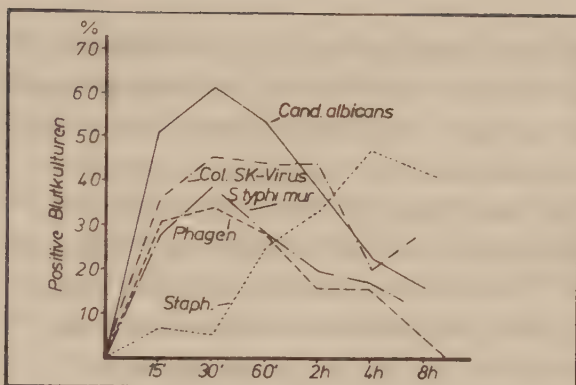


Abbildung 11: Persorption verschiedener Mikroorganismen aus dem Magen-Darm-Kanal von Mäusen (aus SCHLEWINSKI et al (112)).

Die Erkenntnis, daß intakte Mikroorganismen nach oraler Applikation persorbiert werden, ist insofern von Bedeutung, als LEFÈVRE et al (81) aufgrund ihrer Untersuchungen zu folgender Erkenntnis kamen: "Voraussetzung für eine humorale Antikörperbildung auf oralem Weg, wenn sie ähnlich der parenteralen Immunisierung sein soll, ist, daß Antigene über den Darm unverändert den Kreislauf erreichen".

Im Gegensatz zu LEFÈVRE et al (81), die als Voraussetzung für die Entstehung einer generellen Immunität die Persorption von Mikroorganismen ansehen, sind HOF et al (66; 67) der Ansicht, daß andere Mechanismen hierfür verantwortlich zu machen sind. Aufgrund ihrer Erkenntnisse, nach Untersuchungen über orale

Vaccination mit inaktivierten *B. pertussis*-Keimen an Mäusen, sind sie der Auffassung, daß eine generelle Immunität nach oraler Vaccination durch einen direkten Kontakt des Immunogens mit Lymphozyten entsteht, die sich in der Lamina propria mucosae, den Peyer'schen Plaques und zwischen den Epithelzellen des Dünndarmes vorfinden. (Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte beispielsweise nachgewiesen werden, daß Makromoleküle unverändert die Dünndarmmukosa passieren können und ins Lymphgewebe der Peyer'schen Plaques gelangen (27)).

Nach einer Stimulierung dieser, sich in der Dünndarmwand befindlichen Lymphozyten durch das oral applizierte Antigen, werden die dann zu "immunkompetenten Lymphozyten" umgewandelten Zellen in den zirkulierenden Lymphozytenpool eingeschleußt und bewirken somit eine generelle Immunität gegenüber dem entsprechenden Keim.

GRAU (55) konnte bei der Untersuchung histologischer Serienschritte des Dünndarmes beobachten, daß regelmäßig und insbesondere nach Nahrungsaufnahme aus der Lamina propria mucosae und den Peyer'schen Plaques Lymphozyten ins Darmlumen übertreten und wieder in

die Darmwand rezirkulieren. Über den Sinn und Zweck dieser Lymphozytenmigration konnten bislang nur Spekulationen angestellt werden.

Als mögliche Erklärung könnte man sich vorstellen, daß im Darmlumen ein direkter Kontakt zwischen den ins Darmlumen übergetretenen Lymphozyten und den, bei der Nahrungsaufnahme einverleibten Mikroorganismen und deren Toxinen stattfindet. Nach einer Rezirkulation der ins Darmlumen eingewanderten Lymphozyten in die Darmwand und Weitertransport in den zirkulierenden Lymphozytenpool, könnte auf diesem Weg eine generelle Immunität gegenüber enteral aufgenommenen Keimen entstehen.

Für beide Theorien zur Entstehung einer systemischen Immunantwort nach oraler Vaccination, der Persorptions-theorie einerseits, der Möglichkeit der Stimulierung der lokalen Immunorgane des Darmtraktes andererseits, gibt es zahlreiche Hinweise und Untersuchungen. Da sich die beiden Theorien gegenseitig nicht ausschließen, wäre es denkbar, daß eine systemische spezifische Abwehrreaktion über beide Mechanismen erzielt werden kann.

Spekulativ könnte man sagen, daß bei der oralen Immunisierung gezielt Abwehrmechanismen stimuliert werden, die uns üblicherweise vor Infektionen durch die tagtäglich mit der Nahrung aufgenommenen Mikroorganismen und der Toxinen schützen.

4. ANMERKUNGEN ZUR ANTIGENDOSIERUNG

Bei der Dosierung der applizierten Antigenmenge sowie beim Applikationsmodus wurden Erfahrungen bereits veröffentlichter Studien berücksichtigt. So enthält z. B. eine Tablette "Typhoral" (Behringwerke AG) 10^{11} Keime. Eine Mindestgesamtdosis von 3×10^{11} Keimen wird empfohlen, um beim Menschen einen wirksamen Impfschutz zu erzielen. Übertragen auf das Gewicht eines Meerschweinchens mußte man eine Gesamtdosis von 10^9 - 10^{10} Keimen applizieren, um einen entsprechenden Impfschutz zu erhalten. RAETTIG (103) fand bei seinen Untersuchungen mit *S. typhi murium* im Tiermodell mit Mäusen einen optimalen Impfschutz nach einer Applikation von 10^9 Keimen. Bei vergleichenden Untersuchungen sowohl mit höherer wie auch niedrigerer Keimzahl fand sich ein niedrigerer Wirkungsindex. RAETTIG (103) konnte feststellen, daß

der Wirkungsindex der applizierten Antigenmenge nicht direkt proportional ist. Unerwarteterweise nahm die Schutzwirkung nach Überschreiten einer gewissen Optimaldosis wieder ab.

Gesamtdosis der oralen Impfung	Wirkungsindex
10^6 Keime	39,5
10^7 "	62,2
10^8 "	66,5
10^9 "	73,5
10^{10} "	44,4
10^{11} "	42,8
10^{12} "	55,1

Die Tabelle 6 zeigt eine Gegenüberstellung der applizierten Gesamtantigendosis zum entsprechenden Wirkungsindex. (Entnommen aus H. RAETTIG (103), Grundlagen und Erfolge).

Weiterhin prüfte RAETTIG (103) den Impfrhythmus. Durch Variation der Anzahl der Einzeldosen konnte er herausfinden, daß erst nach Aufteilung der Antigenmenge auf mindestens fünf Einzeldosen ein sicherer Impfschutz gewährleistet wurde. Bei weiterer Aufteilung konnte der Impfschutz sogar noch etwas gesteigert werden.

Bei den eigenen Versuchen mit *Ps. aeruginosa* als Testkeim und Meerschweinchen als Versuchstiere wurde eine Gesamtdosis von 10^{10} Keimen, aufgeteilt auf 10 Einzelgaben zu je 10^9 Keimen, appliziert. Nur der Testgruppe G_5 wurde die Gesamtdosis von 10^9 Keimen auf einmal gegeben. Obwohl in diesem Versuch ein Lebendimpfstoff verwendet wurde, der, wie aus vergleichender Literatur ersichtlich ist (47), einen höheren Impfschutz gewährleistet als z. B. eine inaktivierte Vaccine, konnte bei der Gruppe G_5 nur ein Wirkungsindex von 33,3 gefunden werden. Im Vergleich hierzu konnte bei den Gruppen G_3 und G_4 , die einen hitzeinaktivierten Impfstoff erhielten, die Gesamtdosis der Vaccine jedoch auf 10 Einzelgaben aufgeteilt war, mit einem Wirkungsindex W von 56,0 der Gruppe G_4 und $W = 68,2$ der Gruppe G_3 ein wesentlich wirksamerer Impfschutz erzielt werden.

5. ANMERKUNG ZU MÖGLICHEN IMPFSTOFFNEBENWIRKUNGEN

Die oral verabreichte Vaccine wurde von allen Versuchstieren ausnahmslos sehr gut vertragen. Dies gilt sowohl für die inaktivierte, wie auch für die Lebendvaccine. Der Kot der Tiere blieb konsistent, Diarrhoe konnte in keinem Fall beobachtet werden. Die Tiere zeigten normales Freßverhalten, weder allergische Reaktionen, noch Abgeschlagenheit konnte beobachtet werden; die oral vaccinierten Tiere verhielten sich während und nach der Vaccination ebenso unauffällig wie die Tiere der Kontrollgruppe.

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern konnten bei der oralen Vaccination keinerlei auffällige Nebenwirkungen, wie sie z. B. bei den parenteral vaccinierten Tieren auftraten, beobachtet werden.

6. BEURTEILUNG DER VACCINATIONSERGEBNISSE

6.1. KONTROLLINFEKTION

Der Impfschutz nach oraler bzw. parenteraler Vaccination wurde in dieser Studie anhand der Letalitäts-

bestimmung nach intraperitonealer Kontrollinfektion beurteilt.

Bis noch vor wenigen Jahren galt der Anstieg spezifischer Antikörper im strömenden Blut als ausschlaggebender Parameter für den Erfolg einer Vaccination. Aufgrund der Tatsache, daß es nach enteraler Vaccination nicht konstant zu einem meßbaren Anstieg spezifischer agglutinierender Antikörper im Blut kommt, wurde der oralen Immunisierung lange Zeit nur geringe Bedeutung beigemessen. Einzig und allein der Antikörpernachweis als Beweis, daß nach einer Vaccination tatsächlich eine Immunantwort des Organismus erfolgt, kann heute nicht mehr als akzeptabel betrachtet werden (GERMANIER 51; JONES et al 74; RAETTIG 104).

RAETTIG et al (104) betrachten als entscheidendes Kriterium für den Grad einer Immunität nach jeder Impfung nicht den aktuellen Antikörpertiter im strömenden Blut, sondern die Fähigkeit immunkompetenter Zellen, bei einer Infektion rasch mit einer Ausschüttung von spezifischen Antikörpern antworten zu können.

LIETZ (83), GRABEN (54), GERMANIER (51) und weitere Autoren bestimmten den Wirkungsindex der von ihnen

untersuchten oralen Vaccine jeweils anhand der Letalität nach einer Kontrollinfektion mit dem homologen Keim, also nach den gleichen Kriterien, die auch bei dieser Studie zur Beurteilung dienten.

Wie die vorgelegten Ergebnisse zeigen, kann mittels einer mehrmaligen oralen Applikation von *Ps. aeruginosa*-Vaccine (sowohl mit Lebendvaccine, mit hitzeinaktivierter Vaccine wie auch mit einer korpuskelfreien Vaccine, die vermutlich aus Stoffwechsel- und Zerfallsprodukten von *Ps. aeruginosa* besteht) mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Schutz vor intraperitonealer Infektion mit dem homologen Keim erzielt werden. Nach zehnmaliger oraler Vaccination konnte bei allen, in dieser Studie verwendeten Impfstoffen mit $p < 0,0005$, ein signifikanter Impfschutz erzielt werden.

Die einzige Versuchsgruppe, bei der nach oraler Vaccination kein signifikanter Impfschutz erzielt werden konnte, war die Gruppe G_5 . Trotz eines Wirkungsindex von $W_5 = 33,3$ gegenüber eines Wirkungsindex von $W_7 = 7,7$ der nicht vaccinierten Gruppe (siehe Abb. 12) erwies sich der Impfschutz statistisch (t-Test) nicht als signifikant.

Ein hervorragender Impfschutz konnte bei den Versuchsgruppen G_1 , G_2 und G_3 erzielt werden (siehe auch Tabelle 1). Auch bei der Versuchsgruppe G_4 fand sich nach Vaccination ein signifikanter Impfschutz gegenüber der Kontrollgruppe.

Erfreulicherweise betrug der Impfschutz der hitzeinaktivierten Vaccine V_3 87,7 % des Impfschutzes der Lebendvaccine V_2 (siehe Abb. 12). Ähnliche Ergebnisse fanden FONTAGES et al (47) bei ihren Studien mit Lebendvaccine und hitzeinaktivierter Vaccine mit *S. typhi murium* im Tierversuch. Nach dreistündiger Hitzeinaktivierung bei 63°C konnten sie bei der hitzeinaktivierten Vaccine gegenüber der Lebendvaccine einen Impfschutz von 70 % nachweisen.

Wegen des Infektionsrisikos verbietet sich auch die orale Applikation einer aus pathogenen Erregern hergestellten Lebendvaccine bei Patienten. Deswegen wird immer wieder versucht, einen inaktivierten antibakteriellen Impfstoff mit hoher immunogener Wirksamkeit herzustellen. Eine hitzeinaktivierte Vaccine, die bei oraler Applikation 89,7 % der Wirksamkeit einer Lebendvaccine aufweist, könnte diese Anforderung hinreichend erfüllen (siehe Abb. 12).

Der beste Impfschutz nach oraler Vaccination konnte nach oraler Applikation der Vaccine V_1 (lebende Keime im Anzuchtmedium) erzielt werden. Mit einem Wirkungsindex von $W_1 = 78,3$ konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit $W_7 = 7,7$ eine hochsignifikante Schutzimmunität gegenüber einer intraperitonealen Infektion mit dem homologen Keim erzielt werden (siehe Abb. 12).

Der Impfschutz der Vaccine V_2 (lebende, in 0,9%-iger Kochsalzlösung gewaschene Keime) erwies sich mit einem Wirkungsindex von $W_2 = 76,0$ gegenüber der Vaccine V_1 mit $W_1 = 78,3$ praktisch als gleichwertig (siehe Abb. 12). Wie die Untersuchungsergebnisse beim Vergleich von V_1 zu V_2 zeigen, konnte durch Zusatz bakterieller Zerfalls- und Stoffwechselprodukte keine ausschlaggebende Verbesserung des Impfschutzes erzielt werden. Andererseits konnten allerdings auch keine negativen Eigenschaften des nicht gereinigten Impfstoffes V_1 gegenüber der gereinigten Vaccine V_2 festgestellt werden, insbesondere keine Verschlechterung der immunogenen Potenz und keine Nebenwirkungen. SCHLEWINSKI et al (112) ermittelte bei ihren Untersuchungen zur Persorptionskinetik von Mikroorganismen, daß z. B. eine im Anzucht-

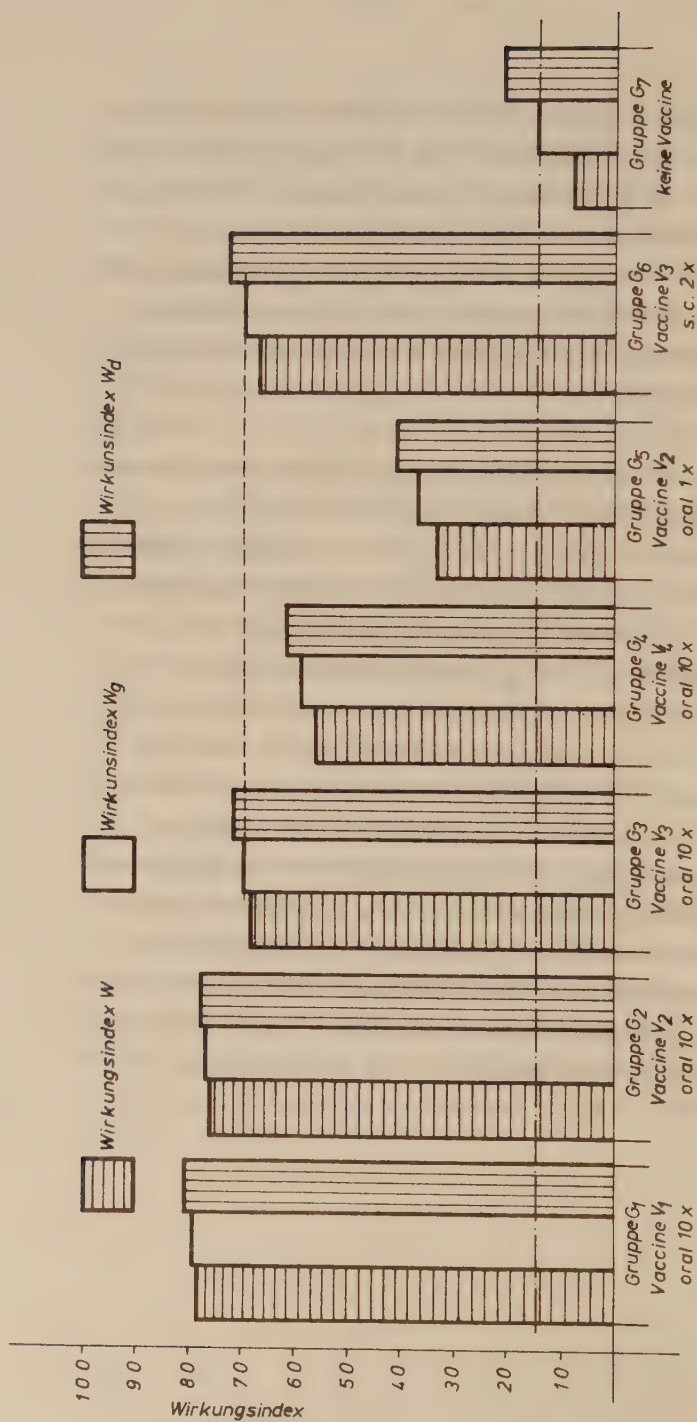


Abb. 12: Vergleich der Wirkungsindizes W , W_g und W_d der verschiedenen Versuchsgruppen $G_1 - G_6$ nach oraler bzw. parenteraler Vaccination mit den Vaccinen $V_1 - V_4$ sowie der Kontrollgruppe G_7 .

medium verabreichte Staph. aureus-Vaccine gegenüber hochgereinigten Impfstoffen, z. B. von S. typhimurium wie auch Candida albicans, erst mit einer gewissen Verzögerung persorbiert wird (siehe auch Abb. 11). Sie diskutierten als Mechanismus hierfür, daß durch die Nährbouillon mit all den gelösten Substanzen eine Art Schutzkolloid um die Keime entsteht, das erst weggedaut werden muß, bevor die Persorption voll einsetzen kann.

Als Grund für die bessere Wirksamkeit der Vaccine V_1 gegenüber der Vaccine V_2 könnte man in Anlehnung an diese Theorie ebenfalls diskutieren, ob der bessere Wirkungsindex von V_1 gegenüber V_2 auf einer gewissen Schutzfunktion des substratreichen Anzuchtmediums vor denaturierenden Einwirkungen des oberen Gastrointestinaltraktes (Magen Säure, Galle und Pankreasfermente) basiert.

Als weitere Erklärung wäre eine zusätzliche Immunstimulation durch die im Anzuchtmedium vorhandenen Endo- und Exotoxine zu diskutieren. So konnte z. B. mit der Vaccine V_4 , die ausschließlich lösliche Immunogene in Form von Stoffwechsel- und Zerfallsprodukten enthielt, mit einem Wirkungsindex $W_4 =$

56,0 zu $W_7 = 7,7$, ein signifikanter Impfschutz erzielt werden, was für die immunogene Wirkung dieser gelösten Produkte spricht.

Neben der Frage, mittels welcher der oral applizierten Vaccine der sicherste Impfschutz erzielt werden kann, stand vor allem zur Debatte, ob mittels einer oral verabreichten *Ps. aeruginosa*-Vaccine ein adäquater Impfschutz im Vergleich zur parenteralen Applikationsform der gleichen Vaccine erzielt werden kann.

Die Wirksamkeit einer parenteral *Ps. aeruginosa*-Vaccine kann aufgrund eindrucksvoller Veröffentlichungen vieler Untersucher, z. B. ALEXANDER et al (3; 4; 5), ALMS and BASS (7), FELLER (44), FISHER et al (45; 46), JONES (72; 73; 74), LABORDE und deFAJARDO (78), LUSIS and SOLTYS (88), MILER et al (93) sowie REYNOLDS et al (105; 106) als gesichert betrachtet werden.

In dieser Studie wurde bei den Versuchsgruppen G_3 und G_6 zur oralen und subcutanen Immunisierung mit der Vaccine V_3 der gleiche Impfstoff verwendet (hitzeinaktivierte, zweimal in 0,9%-iger Kochsalzlösung

gewaschene *Ps. aeruginosa*-Erreger). Der Gruppe G_3 wurden dabei 10×10^9 Keime oral, der Gruppe G_6 2×10^9 Keime subcutan verabreicht.

Applikationsform	oral 10×10^9 K.	s.c. 2×10^9 K.
Wirkungsindex W	68,2	66,7
Wirkungsindex W_d	71,7	72,2
Wirkungsindex W_g	69,9	69,4

Tabelle 7: Vergleich der Wirkungsindizes der Vaccine V_3 nach oraler und nach subcutaner Vaccination.

Berücksichtigt man bei diesem Vergleich der beiden Impfstoffapplikationsformen den Wirkungsindex W, der sich aus der Letalität der Versuchstiere errechnet, den Wirkungsindex W_d , der sich aus der durchschnittlichen Überlebenszeit der Tiere errechnet, und ermittelt hieraus den gemeinsamen Wirkungsindex W_g , so kann man beim Vergleich von der Gruppe G_3 mit G_6 überraschenderweise feststellen, daß nach oraler wie auch nach subcutaner Immunisierung praktisch der gleiche Wirkungsindex der Vaccine V_3 gefunden wird (siehe Tab. 7).

Anhand des Untersuchungsergebnisses dieser Studie kann ausgesagt werden, daß nach oraler Immunisierung mit 10×10^9 Keimen einer hitzeinaktivierten, monovalenten Ps. aeruginosa-Vaccine ein gleichwertiger Impfschutz zu einer zweimaligen subcutanen Vaccination erzielt werden kann.

Im Vergleich zu den oral verabreichten Lebendimpfstoffen konnte nach subcutaner Immunisierung mit hitzeinaktivierter Vaccine desselben Keimes nur ein fast adäquater Impfschutz erzielt werden (vergleiche auch Abb. 12).

6.2. BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE DER DIREKTEN BAKTERIEN-AGGLUTINATION (WIDAL-REAKTION (41))

Mittels der Kontrollinfektion konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, daß nach oraler Vaccination mit Ps. aeruginosa-Vaccine ein signifikanter Impfschutz erzielt werden kann. Die Frage der Spezifität der Immunantwort nach oraler Immunisierung wurde durch den Nachweis spezifischer humoraler Antikörper in Form der direkten Bakterienagglutination nach WIDAL (55) untersucht. Nach HALLMANN (58) dient diese Unter-

suchung "zum Nachweis spezifischer Agglutinine, die sich unter immunologischer Einwirkung entsprechender Bakterien, sei es im Verlauf einer Infektionskrankheit, sei es infolge einer Schutzimpfung oder Vaccination, bilden".

Es wurde nur eine Soma- oder O-Agglutination durchgeführt. Dies geschah zum einen aus Gründen der geringen Serummenge, die mittels Herzpunktion gewonnen werden konnte (O-Agglugene sind im Bakterienleib verankerte thermostabile Antigene), zum anderen sind H-Agglugene (Geißelantigene) thermolabil, was bedeutet, daß die H-Agglugene bei der Hitzeinaktivierung der Vaccinen V_3 und V_4 bereits bei der Impfstoffherstellung zerstört worden waren und somit bei einem Großteil der Versuchstiere keine Immunantwort gegenüber H-Antigenen zu erwarten war. Dabei konnte bei allen Versuchsgruppen ein signifikanter Anstieg der agglutinierenden Antikörper gegen das Soma- bzw. O-Agglugen des zur Immunisierung verwendeten Ps. aeruginosa-Stammes nachgewiesen werden. Bei den Tieren der Kontrollgruppe konnte selbst bei der niedrigsten Verdünnung von 1 : 4 bei keinem der untersuchten Sera ein positiver Ausfall der Agglutinationsreaktion gefunden

werden. Dies bedeutet, daß vor der Immunisierung keines der Versuchstiere einen, zur Antikörperbildung führenden Kontakt mit *Ps. aeruginosa*-Keimen gehabt hatte.

Bei den Sera der oral immunisierten Tiere konnte je nach Versuchsgruppe ein durchschnittlicher Antikörpertiter zwischen 1 : 4 bis 1 : 8 ermittelt werden. Weiterhin zeichneten sich innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen starke Schwankungen bei den Titeranstiegen ab. Beispielsweise konnte in der Gruppe G₁ bei vier Tieren ein Titeranstieg auf 1 : 32 nachgewiesen werden, während sieben Tiere keinen nachweisbaren Titeranstieg zeigten. Mittels Kontrollagglutinationen gegen *Klebsiella pneumoniae*-Keime konnte nachgewiesen werden, daß es sich, da hier die entsprechenden Agglutinationsreaktionen negativ ausfielen, um spezifische Antikörper gegen *Ps. aeruginosa* handelte. Weiterhin ist bekannt, daß es nach enteraler Vaccination nicht so konstant zu einem meßbaren Anstieg spezifischer Agglutinine kommt wie nach parenteraler (103), wie es auch bei diesen Untersuchungen der Fall war. So wurde beispielsweise bei der Gruppe G₆ nach s. c. Immunisierung mit einem

durchschnittlichen Titeranstieg auf $-lb\ 5,11 = 1 : 34,5$ der höchste Wert aller Versuchsgruppen gemessen. Von den oral vaccinierten Tieren fand sich bei der Gruppe G_2 (2 x gewaschene Lebendvaccine in Kochsalzlösung) der höchste Titeranstieg mit $-lb\ 2,72 = 1 : 6,6$.

Statistisch gesehen konnte bei allen oral immunisierten Versuchsgruppen ein signifikanter Anstieg spezifischer Antikörper gegen *Ps. aeruginosa* nachgewiesen werden, was als Hinweis für die Spezifität der Immunreaktion gewertet werden kann.

Eine direkte Beziehung zwischen dem Wirkungsindex nach der Kontrollinfektion und dem durchschnittlichen Antikörperanstieg der einzelnen Gruppen konnte nicht gefunden werden.

6.3. BEURTEILUNG DER ERGEBNISSE DER IMMUNDIFFUSION

Die Bestimmung der Gesamtgammaglobuline, der Gamma-globulinfraktionen IgG und IgM sowie der Komplementfraktion C_3 erfolgte mittels der radialen Immundiffusion nach MANCINI (86). Da für Meerschweinchen weder standardisierte Sera, noch Antisera erhältlich

waren, konnten nur vergleichende Messungen durchgeführt werden. Gemessen wurden die Flächen der Präzipitatringe abzüglich der Flächen der Stanzlöcher. Die Ergebnisse wurden in mm^2 angegeben. Die Auswertung erfolgte durch einen Vergleich der Meßergebnisse der Versuchsgruppen von vor und nach der Vaccination mittels des gepaarten t-Testes (52; 126). Standardisierte Sera hätten zur Auswertung dieser Untersuchungen keinen ersichtlichen Vorteil erbracht.

6.3.1. GESAMTGAMMAGLOBULINE

Nach einer Vaccination ist ebenso wie nach einer Infektion ein Anstieg der Immunglobuline zu erwarten. Deshalb lag es nahe, auch in dieser Studie Veränderungen des Serums im Bereich der Gammaglobuline zu untersuchen.

Mittels der radialen Immundiffusion RID (89) wurden die Veränderungen der Gesamtgammaglobuline nach der oralen Vaccination gemessen. Dabei konnten Anstiege zwischen 35,3 % und 46,4 % bei den einzelnen Gruppen ermittelt werden. Auffallenderweise zeigten die Versuchsgruppen mit dem höchsten Wirkungsindex nach Kon-

trollinfektion den geringsten Anstieg der Gesamt-gammaglobuline. Die durchschnittlichen Werte der einzelnen Gruppen nach Immunisierung lagen jedoch alle signifikant (t-Test) höher als der Normalwert. Dieser Normalwert wurde aus Sera ermittelt, die vor der Vaccination von 42 "blind herausgegriffenen" Versuchstieren gewonnen worden waren.

6.3.2. IgG- UND IgM-IMMUNGLOBULINFRAKTIONEN UND ZUSÄTZLICHE ASPEKTE ZU IgA

Weiterhin wurden, um eventuell differenziertere Aussagen über die Immunglobulinveränderungen machen zu können, vor und nach der Vaccination die Immunglobulinfraktionen IgG und IgM ermittelt und verglichen. In Ermangelung eines IgA-Antiserums mußte auf die Bestimmung dieser Immunglobulinfraktion verzichtet werden. Dabei wäre eine Untersuchung dieser Fraktion aufgrund der hohen Präsenz IgA-produzierender Zellen in der Darmschleimhaut (132) sicherlich ebenfalls interessant gewesen.

Es sollte jedoch an dieser Stelle erwähnt werden, daß es noch keine einheitliche Meinung über die

spezifische Bedeutung des Serum-IgA's gibt. Seine Serumkonzentration beträgt ca. 25 % der des IgG, seine Halbwertszeit ist mit 5 - 6 Tagen etwa ebensolang wie die von IgM, jedoch wesentlich kürzer als die von IgG (68). Das Serum-IgA zeigt in Form von 7S-Molekülen nur geringe chemische Unterschiede zum IgG, es neigt jedoch zur Aggregation zu Molekülen mit höheren Sedimentationskoeffizienten und hat neben einem höheren Kohlenhydratanteil einen niedrigeren Isoelektrischen Punkt (35; 68). Im Gegensatz zu IgG und IgM ist IgA nicht zur Komplementfixation befähigt, deshalb besitzt IgA weder opsonierende, noch leukotaktische, noch zytotoxische Antikörperaktivitäten (35; 68).

Als spezielle biologische Funktion der IgA-Antikörper kann die Schutzwirkung auf muköse Oberflächen angesehen werden. IgA findet sich in Form von sekretorischem IgA in den meisten Sekreten exokriner Drüsen des Gastrointestinaltraktes sowie in der Tränenflüssigkeit, im Nasenschleim, im Tracheobronchialsekret und im Kolostrum (68). IgA stellt das Hauptimmunglobulin dieser Sekrete dar (68). Es ist hier in vergleichbar höherer Konzentration als andere Immun-

globuline vorhanden (124; 125) und außerdem stärker angereichert als im Serum (62).

Das sekretorische IgA (IgA_s) unterscheidet sich vom Serum-IgA (IgA) dadurch, daß es in vorwiegend dimerer Form (11S-Form) oder schwerer vorliegt und zusätzliche Komponenten, die keine immunologische Funktion aufweisen, in Form einer "sekretorischen Komponente (SC)" (115) und einer sog. "J-chain" (59), besitzt (30; 35; 68). Während nur ca. 10 - 13 % des IgA_s als monomerer Molekül vorgefunden wird (28), liegt ca. 80 - 90 % des Serum-IgA als Monomer vor (129).

Besondere Bedeutung ist dem IgA_s bei der oralen Immunisierung beizumessen. Nach dem derzeitigen Stand der Forschung kann eine Immunantwort nach oraler Antigengabe als gesichert angesehen werden, bei vielen Untersuchungen wurden IgA-Antikörper als vorherrschende Immunglobuline gefunden (21; 35; 38; 69).

Nach HUSBAND et al (69) erfolgt nach oraler Antigenapplikation die Sensibilisierung immunkompetenter Lymphozyten im Lymphgewebe der Peyer'schen Plaques. Es konnte der Nachweis erbracht werden, daß Makromoleküle und sogar Bakterien nach unveränderter

Passage des Darmepithels das Lymphgewebe der Peyer'schen Plaques erreichten (27; 34). Die Lymphozyten der Immunorgane des Darmes unterliegen einem normalen Rezirkulationsmechanismus und gelangen über die Mesenteriallymphknoten in den Ductus thoracicus und von hieraus in den Blutkreislauf und auf diesem Weg wieder in die lymphatischen Gewebe des Darmes zurück. Sensibilisierte Lymphozyten gelangen auf diesem Weg, auf dem sie einen gewissen "Reifungsprozeß" durchlaufen, in die Lamina propria des Dünn- und Dickdarmes, wo sie sich zu Plasmazellen differenzieren. In aboraler Verlaufsrichtung des Darmes findet sich trotz Zunahme der intracavitären Keimzahl eine Abnahme der Plasmazellkonzentration in der Lamina propria (69).

IgA-produzierende Plasmazellen bilden in der Darmmucosa den vergleichsweise größten Anteil. So konnte in der Intestinalmucosa des Jejunums durchschnittlich 81 % IgA-, 17 % IgM- und 2,6 % IgG-bildende Plasmazellen gefunden werden, im Ileum waren es durchschnittlich 83 % IgA-, 11 % IgM- und 5 % IgG-bildende Plasmazellen und im Dickdarm 90 % IgA-, 6 % IgM- und 4,2 % IgG-bildende Plasmazellen (29). Die Synthese der Immunglobulinmoleküle erfolgt in den

Plasmazellen der Lamina propria, dort entstehen durch Koppelung von jeweils zwei IgA-Monomeren an ein Polypeptid, sog. "J-chain" (96), IgA-Dimere. Nach Verlassen der Plasmazellen verbinden sich diese IgA-Dimere mit einer weiteren Komponente, die sich als spezifischer Rezeptor in der Zellmembran sekretorischer Epithelzellen des Darmes befindet und als sog. "Secretorische Komponente (SC-Komponente)" (115) bezeichnet wurde. Dieser "2IgA-J chain-SC-Komplex" (IgAs) wird nach Durchwanderung der sekretorischen Darmepithelzellen (Pinozytose) ins Darmlumen sezerniert (30). Die immunologische Bedeutung des IgAs ist in seiner Funktion als neutralisierender Antikörper von Viren (z. B. Poliomyelitis) und Toxinen sowie als Schutzfaktor gegenüber dem Angriff von Darmbakterien auf die Darmmukosa zu sehen (33).

In Zusammenhang mit der oralen Immunisierung gegen *Ps. aeruginosa* mit verschiedenen Impfstoffen wäre eine Studie über Veränderungen des IgAs sicherlich interessant und aufschlußreich gewesen. Die aufwendigen Untersuchungen würden jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen.

Vergleichsweise interessante Ergebnisse finden sich in einer 1979 veröffentlichten Studie von CHIDLOW &

PORTER (36). Sie untersuchten die Veränderungen von Immunglobulinen in Schweinekolostrum nach oraler und parenteraler Vaccination mit *E. coli*. Nach parenteraler Immunisierung fanden sie folgende prozentuale Verteilung der Immunglobuline: 5 % IgG, 6 % IgA und 89 % IgM, nach oraler Immunisierung 19 % IgG, 46 % IgA und 35 % IgM. Während nach parenteraler Immunisierung IgM als dominierendes Immunglobulin gefunden wurde, fand sich nach oraler Immunisierung ein Vorherrschen der IgA-Antikörper. Dies kann möglicherweise als Hinweis gewertet werden, daß abhängig von der Art der Antigenapplikation der Organismus mit unterschiedlicher Immunantwort reagiert.

Die Veränderungen der IgM-Immunglobulinfraktion nach Kontakt eines Organismus mit einem bakteriellen Antigen bzw. Immunogen, werden in der Literatur allgemein als eine "Sofortreaktion" beschrieben, im Gegensatz zum verzögerten Auftreten von IgG-Globulinen (95; 132). Nach Antigenkontakt kommt es nach etwa 2 bis 7 Tagen zu einer vermehrten IgM-Synthese, die sich ohne weitere Antigengaben nach ca. 3 Wochen wieder rückläufig verhält (65). Die Halbwertszeit von IgM beträgt ca. 5 - 6 Tage (109; 132).

Wie aus den Ergebnissen ersehen werden kann, findet sich nach oraler Vaccination sowohl bei den IgG-, wie auch bei den IgM-Immunglobulinen ein signifikanter Anstieg.

Bei der IgG-Fraktion konnte nach oraler Vaccination ein Anstieg zwischen 68 % bei der Gruppe G₁ bis 89,8 % bei der Gruppe G₃ gefunden werden. Die subcutan immunisierte Gruppe G₆ zeigte mit 30,3 % im Vergleich zu den oral immunisierten Tieren einen unerwartet geringen Anstieg.

Die Zunahme der IgM-Fraktion betrug zwischen 43 % und 75,1 %. Die subcutan immunisierte Gruppe G₆ zeigt dabei mit 60,2 % fast den gleichen Anstieg wie die oral mit dem gleichen Impfstoff immunisierte Gruppe G₃ (58,7 %).

Interessanterweise konnte gefunden werden, daß nach oraler Immunisierung mit der hitzeinaktivierten Vaccine ein durchschnittlich höherer Anstieg der Gesamtglobuline wie auch Globulinfraktionen erfolgte als nach subcutaner Immunisierung. Eine direkte Beziehung zwischen dem Wirkungsindex nach der Kontrollinfektion und der Zunahme

der Globuline bzw. der Globulinfraktionen konnte nicht ermittelt werden. Entsprechende Ergebnisse finden sich bei Veröffentlichungen von RAETTIG und BASE (104), die nach oraler Vaccination mit *S. typhi murium* ebenfalls keine direkte Beziehung zwischen der tatsächlichen Schutzwirkung und der Höhe des IgM-Anstieges nach oraler Vaccination feststellen konnten.

7.3.3. BETRACHTUNGEN ZUM KOMPLEMENTFAKTOR C₃

Das Komplementsystem ergänzt das humorale und das zelluläre Immunsystem, es wird deshalb auch als "dritte Bein" der Infektabwehr bezeichnet (77). Im Gegensatz zur humoralen und zellulären Infektabwehr handelt es sich hierbei um eine völlig unspezifische Abwehrreaktion, die sich, selbst bei entsprechender Markierung durch einen der beiden spezifischen Immunmechanismen, gegen körpereigene Zellen richtet.

Biochemisch betrachtet handelt es sich bei den Komplementfaktoren, insgesamt werden neun Hauptfaktoren (C₁ bis C₉) beschrieben, um Plasmaproteine, genauer gesagt um Globuline mit einer für die einzelnen Fak-

toren unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit, die sich vom alpha-1- bis in den Gamma-bereich erstreckt. Die Bildung der einzelnen Faktoren erfolgt zum großen Teil in der Leber, z. B. von C_3 , der Faktor C_1 wird jedoch in Epithelzellen im Colon und Ileum produziert (68).

Ähnlich dem Blutgerinnungssystem werden die einzelnen Faktoren kaskadenartig nacheinander aktiviert. Der zentrale Komplementfaktor C_3 kann dabei auf zwei verschiedene Weisen aktiviert werden, zum einen auf dem klassischen Weg über C_1 , C_2 und C_4 zu C_3 , zum andern über den sogenannten "alternate pathway", einer Nebenschlußaktivierung unter Umgehung der Komponenten C_1 , C_2 und C_4 (68; 77; 79; 116).

Die Aktivierung über den klassischen Weg geschieht durch Anlagerung der C_1 -Komponenten C_{1q} , C_{1r} und C_{1s} , unter Mitbeteiligung von Ca^{++} -Ionen als Bindeglied, an das Fc-Stück einer H-Kette von IgG- oder IgM-Immunglobulinen in Antigen-Antikörper-Komplexen. An einen Ag-Ak C_{1a} -Komplex werden sequentiell, nach vorhergehender Aktivierung, C_2 und C_4 angelagert. Durch die-

sen Ag-AkC_{1a24}-Komplex wird schließlich C₃ aktiviert und in zwei Wirkungskomponenten C_{3a} und C_{3b} gespalten. C_{3b} bildet einerseits mit Ag-AkC_{1a24} einen Komplex zu Ag-AkC_{1a243b}, dessen Bedeutung in der Förderung der Immunadhärenz und Phagozytose zu sehen ist, zum anderen aktiviert C_{3b} über Proaktivatoren im Serum einen Verstärkerkreislauf bzw. einen positiven Feedback-Mechanismus, wodurch die beteiligten C₃-Komponenten vervielfacht werden. Weiterhin kann C_{3b} noch in C_{3c} und C_{3d} gespalten werden, die eine inhibitorische Funktion auf den eben geschilderten Feedback-Mechanismus ausüben. Die bedeutsamste Funktion des C_{3b}-Faktors ist jedoch die weitere sequentielle Aktivierung der Faktoren C₅ bis C₉ und deren Zusammenbau zu einem Komplex. Durch Zusammenlagerung zweier Komplexe zu einem Dimer entsteht ein Molekül, das die Fähigkeit besitzt, Zellmembranen zu durchlöchern und damit irreparabel zu schädigen. Dadurch ist die biochemische Integrität der betroffenen Zelle nicht mehr gewährleistet und über Verschiebungen des Ionengleichgewichtes sowie einer osmotisch bedingten Zellschwellung kommt es zur Zytolyse, der Zerstörung der Zelle (68; 77; 79; 116).

Die Durchlöcherung von Zellmembranen und die damit verbundene Zerstörung von Fremdzellen wird als eine

der wesentlichen Aufgaben des Komplementsystems angesehen (77).

Neben dem eben dargestellten klassischen Weg der Komplementaktivierung konnte noch eine weitere Aktivierungsweise gesichert werden. Bei diesem alternativen Aktivierungsweg handelt es sich um einen Nebenschluß, bei dem die Komplementkomponente C_3 durch gewisse Serumfaktoren, Endotoxine und verschiedene Polyanionen (z. B. Dextran) unter Umgehung der Faktoren C_1 , C_2 und C_4 aktiviert und in die Wirkungskomponenten C_{3a} und C_{3b} gespalten wird. Die Weiteraktivierung über den Faktor C_{3b} geschieht über den bereits vorher ausführlich dargestellten Weg.

Normalabweichungen der Komplementfaktoren im Serum sind bei einer ganzen Anzahl von Erkrankungen bekannt. Neben genetischen Defekten finden sich pathologische Veränderungen des Komplementsystems oder einzelner Faktoren, z. B. beim Lupus erythematodes, bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, z. B. bei der c. P., bei unspezifischen Entzündungsreaktionen in der Akutphase, bei verschiedenen immu-

hämolytischen Anämien, bei der Virushepatitis, bei Erkrankungen mit schwerer Proteinurie sowie bei einigen malignen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen (79; 116).

In der klinischen Routine wird sehr häufig nur der zentrale Faktor der Komplementkaskade, die Komponente C_3 bestimmt. Es handelt sich dabei um ein β_{1c} -Globulin, das mit einer Konzentration von 800 - 1500 mg/l im Humanserum mit Abstand die höchste Quantität aller Komplementkomponenten aufweist (68; 79).

Es gibt verschiedene Bestimmungsmethoden für die Komplementkomponente C_3 . Dabei spielen immunchemische Bestimmungen wie z. B. die radiale Immundiffusion oder die Immunelektrophorese nach Laurell heute die praktisch wichtigste Rolle (79).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels der radialen Immundiffusion untersucht, ob sich im Zusammenhang mit der oralen Immunisierung quantitative Veränderungen des Komplementfaktors C_3 finden lassen. Anmerkend muß jedoch gesagt werden, daß aus einer alleinigen quantitativen Veränderung eines Komplement-

faktors, z. B. C_3 , noch nicht unbedingt auf eine Aktivierung der Komplementkaskade rückgeschlossen werden kann, d.h. daß die Proteinkonzentration des Komplementfaktors C_3 , die mittels der RID ermittelt wurde, noch keinen sicheren Rückschluß über die tatsächliche in-vivo-Aktivität des Komplementsystems zuläßt. Dies liegt daran, daß die für die Bestimmung des Komplementfaktors C_3 verwendeten Antisera eine Antikörperaktivität gegen antigene Determinanten sowohl der nativen wie auch der bereits inaktivierten C_3 -Komponenten enthält und deswegen bei der immunchemischen Untersuchung der C_3 -Komplementkomponente sowohl native wie auch teilweise bereits inaktivierte C_3 -Proteine erfaßt werden (117).

Abweichungen von der Norm finden sich bei den Komplementfaktoren sowohl in einer C-Verminderung wie auch in einer C-Erhöhung. Bei einer C-Verminderung kommen neben erworbenen Veränderungen wie z. B. einer verminderten Synthese, eines gesteigerten Katabolismus, einer Komplementerschöpfung infolge Überaktivierung (Krankheiten mit chron. Überaktivierung des klassischen Weges oder des alternativen Weges) und eines chronischen Verlustes (Proteinurie bei Nephrosen)

auch angeborene Defekte in Frage (116). So konnte in wenigen Fällen bei Patienten, die rezidivierend ihr Leben lang an schweren Infektionen litten, ein C_3 -Mangel gefunden werden (79).

C-Erhöhungen dürften vorwiegend durch eine gesteigerte Synthese der einzelnen Komponenten bedingt sein. Man sieht sie öfter als eine C-Vermindernng (116). Häufig findet man eine C-Erhöhung bei akuten unspezifischen fieberhaften Infekten, meist in Zusammenhang mit einer gleichzeitigen Erhöhung der sogenannten "Akute-Phase-Proteine" (68).

Bei den Untersuchungen der Veränderung der Immunglobuline nach oraler Vaccination fand sich bei allen untersuchten Gruppen, die mit verschiedenen Impfstoffzubereitungen von *Ps. aeruginosa* immunisiert worden waren, ein Anstieg der Gesamtglobuline wie auch der untersuchten Globulinfraktionen. Gammaglobuline sind als wesentliche Aktivatoren des Komplementsystems anzusehen. Andererseits spielen die Komplementfaktoren beim Schutz gegen bakterielle Infektionen eine bedeutende Rolle (68). Unter diesen Aspekten war auch eine Veränderung der Proteinfraction der C_3 -Komponente nach oraler Vaccination zu erwarten.

Bei den Versuchsgruppen G_1 bis G_4 konnte ein signifikanter Anstieg der Komplementkomponente nach oraler Vaccination gegenüber den prävaccinellen Ausgangswerten ermittelt werden. Wenn an dieser Stelle auch als Einwand angeführt werden kann, daß aus einer signifikanten quantitativen Zunahme der C_3 -Komponente nicht verbindlich auf eine signifikante Steigerung der in-vivo-Aktivität des Komplementsystems geschlossen werden kann, so läßt sich doch folgende Erkenntnis gewinnen. In Verbindung mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Immunglobuline, die in Form von Ag-Ak-Komplexen einen klassischen Aktivator des Komplementsystems darstellen und deren Wirksamkeit wiederum vom Vorhandensein aktiver C-Fragmente maßgeblich beeinflusst wird (116), kann eine Erhöhung der C_3 -Komplementfraktion als Hinweis einer verstärkten Abwehrbereitschaft gedeutet werden.

Rückblick auf die Fragen der Einleitung:

Zu 1. Durch orale Vaccination mit unterschiedlich vorbehandelten *Ps. aeruginosa*-Impfstoffen kann ein wirksamer Impfschutz gegen eine nachfolgende intra-

peritoneale Infektion mit einem homologen Keim erzielt werden. Man vergleiche hierzu auch die Ergebnisse von Tabelle 2.

Zu 2. Wie aus Vergleichen des Wirkungsindex der Versuchsgruppen G_3 und G_6 , die mit demselben Impfstoff oral bzw. parenteral vacciniert wurden, ersichtlich ist, kann mittels oraler bzw. parenteraler Vaccination mit *Ps. aeruginosa*-Vaccine ein gleichwertiger Impfschutz erzielt werden. Die Wirksamkeit der einzelnen Impfstoffe wurde anhand des Wirkungsindexes gemessen. Der Vergleich untereinander ergab, daß die beiden Lebendvaccinen einen höheren Wirkungsindex als die hitzeinaktivierten Impfstoffe aufweisen. Der niedrigste Wirkungsindex fand sich bei der Vaccine, die aus hitzeinaktivierten löslichen Stoffwechsel- und Zerfallsprodukten hergestellt wurde. Bemerkenswert ist allerdings, daß mit der hitzeinaktivierten Ganzkeimvaccine fast 90 % des Impfschutzes der Lebendvaccine V_2 erzielt wurde.

Zu 3. Nach oraler Vaccination konnte eine signifikante Erhöhung der spezifischen Antikörper gegen *Ps. aeruginosa* wie auch ein signifikanter Anstieg der IgG-, IgM- und der Gesamtgamma globuline gefunden werden.

Zu 4. Eine direkte Beziehung der Wirkungsindizes zu den labortechnischen Parametern der einzelnen Gruppen konnte nicht gefunden werden.

E) ZUSAMMENFASSUNG

Eine postoperative Infektion mit *Ps. aeruginosa* stellt eine ernste Komplikation dar. Eine aktive Vaccination wurde bisher erfolgreich bei schweren Verbrennungen durchgeführt. Die Immunisierung erfolgte dabei stets parenteral. Über erhebliche Nebenwirkungen wird berichtet.

In diesem Tiermodell wird untersucht, ob eine orale Immunisierung möglich ist und ob damit ein Schutz vor Infektionen mit *Ps. aeruginosa* zu erreichen ist.

Weibliche Pirbright-Meerschweinchen wurden jeweils morgens nach nächtlicher Nahrungskarenz über eine Magensonde mit unterschiedlich hergestellten Impfstoffen von *Ps. aeruginosa*, Serotyp 2, Pyocintyp 1d, vacciniert. Als wichtigstes Ergebnis wurde die Letalität nach intraperitonealer Infektion gemessen und daraus der Wirkungsindex der Vaccine ermittelt.

Weiterhin wurden labortechnische Daten wie spezifische Antikörper, Gesamtgammaglobuline, die IgG- und IgM-Immunglobulinfraktionen sowie die Komplementfraktion C₃ gemessen.

Durch die orale Vaccination konnte im Tierversuch eine deutliche Abnahme der Letalität nach intra-peritonealer Infektion erzielt werden. Der Wirkungsindex lag je nach Verfahren der Impfstoffherstellung zwischen $W = 79,5$ bei G_1 und $W = 58,6$ bei G_4 nach zehnmaliger oraler Vaccination. Die Ergebnisse erwiesen sich nach statistischer Auswertung (t-Test) gegenüber der Kontrollgruppe G_7 mit $W = 14,5$ als signifikant. Ebenfalls zeigten sich fast alle gemessenen Laborparameter nach zehnmaliger oraler Vaccination signifikant erhöht.

Beim Vergleich von oraler zu parenteraler Vaccination mit hitzeinaktivierter Ganzkeimvaccine konnte bei praktisch gleichem Wirkungsindex mit $W = 69,7$ bei G_3 und $W = 69,4$ bei G_6 eine gleichgute Wirksamkeit der gleichen Vaccinen bei verschiedenen Applikationsformen erzielt werden.

Bei der Untersuchung der Bakterienagglutination fand sich bei allen Gruppen nach Vaccination ein signifikanter Anstieg der spezifischen Agglutinine. Während bei den oral immunisierten Gruppen ein durchschnittlicher Titeranstieg von etwa 2 Titer-

stufen pro Gruppe (max. 2,7 Titerstufen bei G_2) gemessen werden konnte, zeigte sich bei der parenteral vaccinierten Gruppe ein Titeranstieg von über 5 Titerstufen.

Auch die Gammaglobuline stiegen nach oraler und parenteraler Vaccination signifikant an. Dabei konnte mit 175 % des Ausgangswertes bei der Gruppe G_4 (lösliche Abbau- und Stoffwechselprodukte) der höchste Wert ermittelt werden, bei der s. c. immunisierten Gruppe zeigte sich ein Anstieg auf 160,2 %.

Die untersuchten Immunglobulinfraktionen IgG und IgM wiesen nach oraler und parenteraler Immunisierung ebenfalls signifikant erhöhte Werte der einzelnen Gruppen auf.

Bei der Untersuchung der Komplementfraktion C_3 fand sich einzig bei der nur einmal mit Lebendvaccine immunisierten Gruppe G_5 kein signifikanter Anstieg.

Diese Ergebnisse zeigen, daß im Tierversuch mittels mehrmaliger oraler Vaccination sowohl mit Lebendvaccine, mit hitzeinaktivierter Vaccine wie auch

mit Impfstoff aus löslichen Erregerstoffwechsel- und Abbauprodukten ein signifikanter Impfschutz gegen *Ps. aeruginosa*-Infektionen, ohne beeinträchtigende Nebenwirkungen, wie parenteraler Vaccination, erzielt werden kann. Eine entsprechende Untersuchung im humanmedizinischen Bereich steht gegenwärtig noch aus, ähnlich gute Ergebnisse wären jedoch sicherlich bei entsprechender Applikationsform eines Oralimpfstoffes aus *Ps. aeruginosa* zu erwarten.

LITERATUR

1. ADAIR, F. W., GEFTIC, S. G. & GELZER, J.
Resistance of Pseudomonas to Quarternary
Ammonium Compounds.
Appl. Microbiol. 18 (1968) 299 - 302
2. ADAM, D. & MARGET, W.
Die Rolle des Wirts bei der klinischen Wirkung
der antibakteriellen Chemotherapie.
Med. Klinik 66 (1971) 344 - 351
3. ALEXANDER, J. W., FISHER, M. W., MacMILLAN,
B. G. & ALTEMEIER, W. A.
Prevention of Invasive Pseudomonas Infection
in Burns with a New Vaccine.
Arch. Surg. 99 (1969) 249 - 256
4. ALEXANDER, J. W., FISHER, M. W. & MacMILLAN, B. G.
Immunological Control of Pseudomonas Infection
in Burn Patients: A Clinical Evaluation.
Arch. Surg. 102 (1971) 31 - 35
5. ALEXANDER, J. W. & FISHER, M. W.
Immunisation against Pseudomonas Infection
after Thermal Injury.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 152 - 158

6. ALEXANDER, M.

Erregerwechsel in verschiedenen Krankenhausbereichen
im Verlauf der letzten 20 Jahre unter Einfluß der
Antibiotikabehandlung.

Immunität und Infektion 5 (1977) 62 - 65

7. ALMS, T. H. & BASS, J. A.

Immunisation against *Ps. aeruginosa*.

I. Induction of Protection by an Alcohol Precipitated
Fraction of the Slime Layer.

J. Infectious Diseases 117 (1967) 249 - 256

8. ALMS, T. H. & BASS, J. A.

Immunisation against *Ps. aeruginosa*.

II. Purification and Characterisation of the
Protective Factor from the Alcohol-Precipitated
Fraction.

J. Infectious Diseases 117 (1967) 256 - 264

9. ALTEMEIER, W. A., TODD, J. C. & INGE, W. W.

New Aspects of Septicemia in Surgical Patients

Arch. Surg. 92 (1966) 566 - 572

10. ALTEMEIER, W. A., TODD, J. C. & INGE, W. W.

Gramnegative Septicemia: A Growth Threat.

Ann. Surg. 166 (1967) 530 - 542

11. ARMSTRONG, D., YOUNG, L. S., MEYER, R. D. & BELVINS, A. H.
Infectious Complications of Neoplastic Disease.
Med. Clin. N. Am. 55 (1971) 729
12. AUSTIN, L. & JOYNER, M. D.
Acute Staphylococcus Osteomyelitis.
The Use of Staphylococcus Antitoxin as aid to
Management of Toxemia and Staphylococemia.
Surg. Gynec. and Obst. 63 (1936)
13. AXLER, D. A., TLELECKYJ, B. & ABRAMSON, C.
The Microbiologic Aspects of Osteomyelitis.
J. of the Am. Pediatrics Association 67 (1977) 691 - 701
14. BAKER, L. D. & SHANDS, A. R.
Akute Osteomyelitis mit Staphylokokkämie.
Ein klinischer Bericht über die Anwendung von
Antitoxin.
J. A. M. A. 113 (1939) 2119 - 2124
15. BARTELL, P. F., ORR, T. E. & CHUDIO, B.
Purification and Chemical Composition of the
Protective Slime Antigen of *Ps. aeruginosa*.
Infect. Immun. 2 (1970) 543 - 548
16. BARANDUM, S. & MORELL, A.
Immunsustitution mit Gammaglobulinen
Sandorama 5 (1979) 11 - 13

17. BARTH, F., MÜHLBAUER, P., NIKOL, F. & WÖRLE, K.
Mathematische Formeln und Definitionen, 2. Aufl.
Bayerischer Schulbuch-Verlag, München 1973
18. BASIL, C. A. & PRUITT, J.
Infections Caused by *Pseudomonas* Species in
Patients with Burns and in other Surgical Patients.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 8 - 13
19. BAUERNFEIND, A., PETERMÜLLER, C. & BURROWS, D. R.
Modifiziertes Verfahren zur Pyocintypisierung
von *Ps. aeruginosa*.
Zbl. Bak. Hyg. I. Abt. Org. A. 240 (1978) 271 - 278
20. BAZIN, H.
Specific Tolerance obtained by local Antigenetic
Stimulation of Mucosal Surfaces.
Protein Transmission through Living Membranes,
Editor: Hemmings, W. A., published by Elsevier/
North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam (1979)
287 - 293
21. BAZIN, H., LEVI, G. & DORIA, G.
Predominant contribution of IgA antibody-forming
cells to an immune response detected in
extraintestinal lymphoid tissues of germ-free
mice exposed to antigens by oral route.
J. Immunol. 105 (1970) 1049 - 1051

22. BENNET, J. V.
Nosocomial Infections to *Pseudomonas*
J. Infectious Diseases 130 (1974) 4 - 7
23. BESREDKA, A.
Die lokale Immunisierung spezifischer Verbände
J. A. Barth, Leipzig 1926
24. BJORNSON, A. B. & MICHAEL, J. G.
Contribution of Humoral and Cellular Factors
to the Resistance to Experimental Infection
by *Ps. aeruginosa* in Mice. I. Interaction between
Immunglobulins, Heat-Labil Serum Factors, and
Phagocytotic Cells in the Killing of Bacteria.
Infect. Immun. 4 (1971) 462 - 471
25. BJORNSON, A. B. & MICHAEL, J. G.
Contribution of Humoral and Cellular Factors
to the Resistance to Experimental Infection by
Ps. aeruginosa in Mice. II. Opsonine, Agglutinine
and Protective Capacities of IgG Anti-*Pseudomonas*
Antibodies.
Infect. Immun. 5 (1972) 775 - 782
26. BJORNSON, A. B. & MICHAEL, J. G.
Factors in Human Serum Promoting Phagocytosis
of *Ps. aeruginosa*. I. Interaction of Opsonins
with the Bacterium.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 119 - 126

27. BOCKMAN, D. E. & COOPER, M. D.
Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study.
Am. J. Anat. 136 (1973) 455 - 477
28. BRANDTZAEG, P., FJELLANGER, J. & GJERULDSSEN, S. T.
Human Secretory Immunglobulins. I. Salivatory secretions from individuals with normal or low levels of serum immunglobulins.
Scand. J. Haematol. Suppl. 12 (1968) 1 - 83
29. BRANDTZAEG, P. & BAKLIEN, K.
Immunohistochemical studies of the formation and epithelial transport of immunoglobulins in normal and disease human intestinal mucosa.
Scand. J. Gastroenterol. 11 (1976) 1 - 45
30. BRANDTZAEG, P. & BAKLIEN, K.
Intestinal secretion of IgA and IgM.
Ciba Foundation Symposium 46, Immunology of the Gut, published by Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1979) 77 - 112
31. BUCHHOLZ, H. W.
Die tiefe Infektion, ein zentrales Problem der Gelenkersatzoperation.
Materia Medica Nordmark 25 (1973) 1 - 2

32. BUCHS, S.
Das ungelöste Problem der Eiweißspaltung im Magen.
Dtsch. med. Wschr. 98 (1973) 1372 - 1376
33. CALLAHAN, L. T. III
Ps. aeruginosa Exotoxin: Purification by Preparative Polyacrylamide Gel Electrophoresis and the Developement of a Highly Specific Antitoxin Serum.
Infec. Immun. 14 (1976) 55 - 61
34. CARTER, P. B. & COLLINS, F. M.
The route of enteric infection in normal mice.
J. Exp. Med. 139 (1974) 1189 - 1203
35. CEBRA, J. J., KAMAT, R., GEBHART, P., ROBERTSON, S. M. & TSENG, J.
The secretory IgA system of the gut.
Ciba Foundation Symposium 46, Immunology of the Gut, published by Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1979) 5 - 28
36. CHIDLOW, J. W. & PORTER, P.
The role of oral immunization in stimulating E. coli antibody of IgM class in porcine colostrum.
Protein Transmission through Living Membranes
Editor: Hemmings, W. A., published by Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, Amsterdam (1979) 233 - 239

37. CRABBÉ, P. A., CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F.
The normal human intestinal mucosa as a major source
of plasma cells containing gamma A-immunoglobulin.
Lab. Invest. 14 (1965) 235
38. CRABBÉ, P. A., NASH, D. A., BAZIN, H., EYSSEN, H. &
HEREMANS, J. F.
Antibodies of the IgA type in intestinal plasma
cells of germ-free mice after oral or parenteral
immunization with ferritin.
J. Exp. Med. 130 (1969) 723 - 744
39. DELREZ, L. & GREGOIRE, R.
Séro- et vaccinothérapie dans les affections
ostéoarticulaires.
Presse méd. 29 (1921) 789 - 790
40. DIMITRAPOULOS, G., SENSACOVIC, J. W. & BARTELL, P. F.
Slime of *Ps. aeruginosa*: In Vivo Production.
Infect. Immun. 10 (1974) 152 - 156
41. DOGETT, R. G.
Incidence of Mucoid *Ps. aeruginosa* from Clinical
Sources.
Appl. Microbiol. 18 (1969) 936

42. EWALD, R. W.
Prophylaxe und Therapie mit i.V. applizierbarem
Immunglobulin: Indikationen
Pharmazeutische Zeitung 18 (1979) 847 - 849
43. FARMER, J. J. III & HERMAN, L. G.
Pyocin Typing of *Ps. aeruginosa*.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 43 - 46
44. FELLER, J.
The use of *Pseudomonas* Vaccine and Hyperimmune
Plasma in the Treatment of seriously burned Patients
Research in Burns edited by Wallace, A. B.
and Wilkinson, W. A., Edinburgh (1966) 470
45. FISHER, M. W.
Development of Immunotherapie for Infections
Due to *Ps. aeruginosa*.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 149 - 151
46. FISHER, M. W., DEVLIN, H. B. & GNABASIK, F. J.
New ImmTOTYPE Schema for *Ps. aeruginosa* Based
on Protective Antigens.
J. Bacteriology 98 (1969) 835 - 836
47. FONTAGES, R., IVANOFF, B. & CREACH, O.
Compared Efficiency of a Killed Vaccine of
Salmonella Typhi murium, a Live Vaccine and
an Antigenetic Fraction in Oral Immunisation
of Mice.
Develop. biol. Standard. 33 (1976) 118 - 123

48. FORKNER, C. E., FREI, E., EDGCOMB, J. H. & UTZ, J. P.
Pseudomonas Septicemia. Observations Twentythree
Cases.
Am. J. Med. 25 (1958) 877 - 889
49. FRANKLIN, M. & FRANKLIN, M. A.
Pseudomonas, ein bakteriologisches Profil.
Beecham Pharma, Mainz-Weisenau (1973)
50. GANSELMAYER, J. H.
Serotherapie und Simultanimpfung bei den Eiterungen
des Menschen und der Tiere.
Tierärztl. Wschr. Nr. 38 (1940) 453 - 456
51. GERMANIER, R.
Vaccination against Typhoid Fever with a Live
Oral Vaccine.
Develop. biol. Standard. 33 (Basel 1976) 85 - 88
52. GEIGY, J. R.
Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen
6. Auflage, Basel 1960
53. GILLES, R. R. & GOVAN, J. R. W.
Typing of Pseudomonas pyocyanea by Pyocin Production
J. Pathol. Bacteriol. 91 (1966) 339 - 345

54. GRABEN, N.
Zur oralen Immunisierung mit hitzeinaktivierten
S. typhi murium-Bakterien in Form einer Wasser-
in-Öl-Emulsion aus kompletten und inkompletten
Freund'schen Adjuvans.
Inaug. Diss., Berlin (1971)
55. GRAU, H.
Tierärztl. Umschau 7 (1972) 328
56. GROSS, H.
Ist eine geeignete Serumtherapie der Osteomye-
litis möglich und erfolgversprechend?
Z. Immunforsch. 79 (1933) 455 - 457
57. HABS, J.
Untersuchungen über die O-Antigene von
Ps. aeruginosa.
Z. Hyg. Infek. Kr. 144 (1957) 218 - 228
58. HALLMANN, L.
Bakteriologie und Serologie
Thieme Verlag Stuttgart (1950)
59. HALPERN, M. S. & KOSHLAND, M. E.
Novel subunit in secretory IgA
Nature (Lond.) 228 (1970) 1276 - 1278

60. HANESSION, S., REGAN, W., WATSON, D. & HASKELL
Isolation and Characterisation of Antigenetic
Components of a New Heptavalent Pseudomonas
Vaccine.
Nature (New Biol.) 229 (1971) 209
61. HELM, E. & STILLE, W.
Klinik und Therapie der Sepsis durch
Ps. aeruginosa.
Dtsch. med. Wschr. 97 (1972) 1584 - 1589
62. HEREMANS, J. F. & VAERMAN, J. P.
Biological significance of IgA antibodies in
serum and secretions.
Progress in Immunology I. (ed. by Amos, B.)
(First International Congress of Immunology)
Academic Press, New York (1971) 875 - 890
63. HERBST, G.
Das Lymphgefäßsystem und seine Verrichtungen.
Göttingen (1844)
64. HIERHOLZER, G. & REHN, J.
Zur Indikation einer zusätzlichen antibiotischen
Therapie bei der chronischen Knocheninfektion.
Sonderdruck: Tagung der Mittelrhein. Chir.-
Vereinigung in Homburg/Saar 6. - 8. Okt. (1966)

65. HITZIG, W. H.
Plasmaproteine. Pathophysiologie und Klinik.
Springer-Verlag, Berlin, 2. Aufl. (1977)
66. HOF, H. & FINGER, H.
Zur Entstehung der generellen Immunität nach
oralen Aufnahme von abgetöteten Pertussisbakt.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A 227 (1973) 282 - 288
67. HOF, H., FINGER, H., KÖRNER, L. & MILCKE, L.
Effectiveness of Orally Administrated Bordetella
Pertussis Vaccine in Mice.
Develop. biol. Standard. 33 (Basel 1976) 47 - 53
68. HUMPHREY, J. H. & WHITE, R. G.
Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2. Aufl.
Thieme Verlag Stuttgart (1972)
69. HUSBAND, A. J., MONIÉ, H. J. & GOWANS, J. L.
The natural history of the cells producing IgA
in the gut.
Ciba Foundation Symposium 46, Immunology of the
Gut, published by Elsevier, Excerpta Medica,
North-Holland publishing Company, Amsterdam
(1979) 29 - 54

70. INTERNATIONAL ASSOCIATION OF BIOLOGICAL
STANDARDIZATION
Developments in Biological Standardization
Vol. 33
Verlag S. Karger, Basel (1976)
71. JAWETZ, E., MELNICK, J. L. & ADELBERG, E. A.
Medizinische Mikrobiologie III. Auflage.
Springer-Verlag Berlin, (1973) 294 - 295
72. JONES, R. J.
Protection against *Ps. aeruginosa* Infection by
Immunisation with Fractions of Culture
Filtrates of *Ps. aeruginosa*.
Br. J. exp. Path. 49 (1968) 411 - 420
73. JONES, R. J.
Early Protection by Vaccines in Burns.
Br. J. exp. Path 52 (1971) 100 - 109
74. JONES, R. J. & ROE, E. A.
Protective Properties and Haemagglutinins in
Serum from Humans and in Serum from Mice Injec-
ted with a new Polyvalent *Pseudomonas* Vaccine.
Br. J. exp. Path. 56 (1975) 34 - 43

75. KINNE-SAFFRAN, E., KURSCHILGAN, E. M.,
MARQUARDSEN, A. & RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen
Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
9. Mitteilung: Tierversuch zur Schutzimpfung
durch enteritiserregende Salmonellen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 208 (1968) 37 - 58
76. KOCIOK, J.
Wirksamkeitsprüfung von Oralimpfstoffen aus
inaktivierten Typhusbakterien im aktiven Mäuse-
schutztest.
Inaug. Diss., Berlin, (1971)
77. KONGRESSBERICHT
Synthese und Aktivierung des Komplementsystems
Die gelben Hefte 3 (1979) 131 - 134
78. LABORDE, H. F. & deFAJARDO, C. L.
Pseudomonas Vaccine. Preparation and Assay.
J. Bact. 90 (1965) 290 - 291
79. LAURELL, A. B.
Komplementfaktoren in der Labormedizin.
Laboratoriumsblätter 27 (1977) 89 - 102
80. LEE, J. C. & FAILKOW, P. J.
Benzalkoniumchloride: Source of Hospital
Infection with gramneg. Bacteria.
J. A. M. A. 177 (1961) 708 - 710

81. LEVEVRE, H., UECKER, W., BLÜMEL, P. & RAETTIG, H.
Untersuchungen zur oralen Immunisierung. Die
secundäre Immunreaktion nach primärer oraler
und nachfolgender oraler bzw. parenteraler
Applikation von bovinem Serumalbumin (BSA)
beim Kaninchen.
Zbl. Bakt. I. Orig. A 213 (1970) 548 - 566
82. LIECHTI, R. & WEBER, B. G.
Beitrag zur Prophylaxe der operativen Infektionen.
Unsere Erfahrung nach vierjähriger Durchführung
präventiver Impfung mit Staphylokokkenvaccine.
Chirurg 44 (1973) 269 - 272
83. LIETZ, B. & RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen
Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 5. Tierversuch zur Schutzimpfung gegen Dyspepsie-Coli-
Infektionen.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 204 (1967) 543 - 554
84. LIU, P. V., ABE, Y. & BATES, I. L.
The Roles of various Fractions of *Ps. aeruginosa*
in its Pathogenesis.
J. Infectious Diseases 108 (1961) 218 - 228

85. LIU, P. V.
Exotoxins of *Ps. aeruginosa*. I. Factors that
Influence the Production of Exotoxin.
J. Infectious Diseases 128 (1973) 501 - 513
86. LIU, P. V.
Extracellular Toxins of *Ps. aeruginosa*.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 94 - 99
87. LOWBURY, E. J. L.
Infection associated with Burns
Postgrad. med. J. 48 (1972) 338
88. LUSIS, P. I. & SOLTYS, M. A.
Immunisation of Mice and Chinchillas against
Ps. aeruginosa.
Can. J. comp. Med. 35 (1971) 60 - 66
89. MANCINI, G., CARBONARA, A. O., & HEREMANS, J. F.
Immunochemical Quantitation of Antigens by
Single Radial Immundiffusion.
Immunochemistry 2 (1965) 235 - 254
90. MARKLEY, K. & SMALLMAN, E.
Protection by Vaccination against *Pseudomonas*
Infection after Thermal Injury.
J. Bact. 96 (1968) 867 - 874

91. MARWIK, G. & SCHMUDELE, R.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen
Mikroorganismen oder ihren Antigenen.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 208 (1968) 26 - 37

92. MEYERS, B. R., BERSON, B. L., GILBERT, M. &
HIRSCHMAN, S. Z.
Clinical Patterns of Osteomyelitis due to
Gram-Negative Bacteria.
Arch. Intern. Med. 131 (1973) 228 - 233

93. MILER, J. M., SPILSBURY, J. F., JONES, R. J. &
ROE, E. A.
A New Polyvalent Pseudomonas Vaccine
J. Med. Microbiol. 10 (1977) 19 - 27

94. NETER, E.
Ps. aeruginosa Infection and Humoral Antibody
Response of Patients with Cystic Fibrosis.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 132 - 133

95. NETER, E. & MILGROM, F.
The Immune system and infectious diseases.
Develop. biol. Standard. 33 (1976)

96. O'DALY, J. A. & CEBRA, J. J.
Chemical and physiochemical studies of the component
polypeptid chains of rabbit secretora IgA.
Biochemistry 10 (1971) 3843 - 3850

97. PAVLOVSKIS, O. R. CALLAHAN, L. T. III & MEYER, R. D.
Characterization of Exotoxins of *Ps. aeruginosa*.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 100 - 103
98. PENNINGTON, J. E.
Preliminary Investigations of *Ps. aeruginosa*
Vaccine in Patients with Leukemia and Cystic
Fibrosis.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 159 - 166
99. PHILIPOWICZ, I.
Konservative Behandlung der Osteomyelitis mit
Vaccine.
Arch. Klin. Chir. 180 (1934) 177 - 178
100. PLAUE, R. & HINZ, P.
Osteomyelitis: Erregerspektrum und Resistenz-
situation.
Arch Orthop. Unfall-Chir. 69 (1970) 83 - 92
101. PRUITT, B. A.
Infections Caused by *Pseudomonas* Species in
Patients with Burns and other Surgical Patients.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 8 - 13
102. RABIN, E. R., GRABER, C. D., VOGEL, E. H.,
FINKELSTEIN, R. D. & TUMBUSCH, W. A.
Fatal *Pseudomonas* Infection in Burned Patients.
A Clinical Bacteriologie and Anatomic Study.
New Engl. J. Med. 265 (1961) 1225 - 1231

103. RAETTIG, H.
Grundlagen und Erfolge der oralen Impfung mit
inaktivierten Mikroorganismen.
Ann. Sclavo, 14 (1972) 504 - 525
104. RAETTIG, H. & BASE, A.
Orale Immunisierung mit nicht vermehrungsfähigen
Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 14. Mit-
teilung: Aktive und passive Immunisierung von
Babymäusen gegen *S. typhi-murium* Infektionen.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Orig. 218 (1971) 310 - 319
105. REYNOLDS, H. Y.
Pulmonary Host Defenses in Rabbits after Immu-
nisation with *Pseudomonas* Antigens: The Interac-
tion Bacteria, Antibodies, Macrophages and Lympho-
cytes.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 134 - 142
106. REYNOLDS, H. Y., THOMPSON, R. E. & DEVLIN, H. B.
Developement of cellular and humoral immunity in
the respiratory tract of rabbits to *Pseudomonas*
lipopolysaccharide.
J. Clin. Invest. 53 (1974) 1352 - 1358
107. RING, J., SEIFERT, J., LOB, G., MERKENS, H.,
PROBST, J. & BRENDEL, W.
Untersuchungen zur Immunologie der chronischen
Osteomyelitis.
Langenbecks Arch. Chir. Suppl., Chir. Forum (1973)
89 - 91

108. RING, J., SEIFERT, J., v. THIEL, D., LOB, G. & PROBST, J.
Chronische posttraumatische Osteomyelitis. 1. Klinik und Bakteriologie.
Fortschr. Med. 94 (1976) 3 - 6
109. SANDRITTER, W. & BENEKE, G.
Allgemeine Pathologie
F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart (1974)
110. SCHICK, F.
Die Ausheilung der Osteomyelitis durch spezifischen Impfstoff.
Dtsch. Militärarzt 6 (1941) 640 - 650
111. SCHLEWINSKI, E.
Bakteriämie nach enteraler Persorption von Staphylokokken und vergleichende lokale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Bakterien.
Inaug. Diss., Berlin (1970)
112. SCHLEWINSKI, E., GRABEN, N., FUNK, J., SAHM, E. & RAETTIG, H.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 13. Mitteilung: Persorption und Sekretion von Mikroorganismen im Tierversuch.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 218 (1971) 93 - 104

113. SEIFERT, J.
Chronische posttraumatische Osteomyelitis und ihre
Bedeutung.
Fortschr. Med. 95 (1977) 1376 - 1380
114. SEWELL, H. F.
Immune Responsiveness associated with oral
immunization.
Protein Transmission through Living Membranes.
Editor: Heremans, W. A., published by Elsevier/
North-Holland Biomedical Press (1979) 295 - 307
115. SOUTH, M. A., COOPER, M. D., WALLHEIM, F. A.,
HONG, R. & GOOD, R. A.
The IgA system. I. Studies of the transport and
immunochemistry of IgA in the saliva.
J. Exp. Med. 123 (1966) 615 - 627
116. SPATH, P.
Komplementveränderungen
Diagnostik 15 (1977) 675 - 679
117. SPATH, P.
Komplementwerte: methodische Prinzipien und
Interpretation.
Diagnostik 15 (1977) 670 - 674

118. STIERLITZ, D. D. & HOLDER, J. H.
Experimental Studies of the Pathogenesis of
Infections due to *Ps. aeruginosa*: Description
of a Burned Mouse Model.
J. Infectious Diseases 131 (1975) 688 - 691
119. STONE, H. H.
Review of *Pseudomonas* Sepsis in Thermal Burns.
Ann. Surg. 163 (1966) 297 - 305
120. SUTTER, V. L., HURST, V., GROSSMANN, M. & CALONJE, R.
Source and Significance of *Ps. aeruginosa* in
Sputum of Patients Requiring Tracheal Suction.
J. Am. Med. Assoc. 197 (1966) 854 - 858
121. SOEDER, H., WILLENEGGER, H. & GOOD, H.
Pyocyaneusinfektion - Osteomyelitis
Referat, gehalten an der 58. Jahresversammlung
der Schweizerischen Gesellschaft für Unfallmedizin
und Berufskrankheiten vom 26. - 28. Okt. 72 in
Bern (Internationale Deutsch-Österreichisch-
Schweizerische Unfalltagung)
122. TAPPER, M. L. & ARMSTRONG, D.
Bacteriemia due to *Ps. aeruginosa* Complicating
Neoplastic Diseases: A Progress Report.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 14 - 32

123. THALBOT, G. H.
Gramnegative Septicemia.
Proc. Roy. Soc. Med. 62 (1969) 1244 - 1246
124. TOMASI, T. B. & ZIEGELBAUM, S. D.
The selective occurrence of gamma A-globulins in
certain body fluids.
J. Clin. Invest. 42 (1963) 1552 - 1560
125. TOMASI, T. B., TANS, E. M., SOLOMON, A. &
PRENDERGAST, R. A.
Characteristics of an immunosystem common to certain
external secretions.
J. Exp. Med. 121 (1965) 614 - 626
126. ÜBERLA, K.
Biomathematik. Erläuterungen und Lernhilfen zum
Gegenstandskatalog.
Überla, Institut für Medizinische Informations-
verarbeitung, Statistik und Biomechanik der
Universität München. München 1974
127. UECKER, W., MEVES, M., RAETTIG, H. & EGGER, I.
Orale Immunisierung mit nichtvermehrungsfähigen
Mikroorganismen oder ihren Antigenen. 6. Mittei-
lung: Tierversuch zur Resorption und Sekretion
von radioaktivmarkierten, bakteriellen Antigenen.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 208 (1968) 2 - 15

128. URBACH, P.
Untersuchungen über orale Autovaccinebehandlung
bei Patienten mit chronischer posttraumatischer
Osteomyelitis.
Inaug. Diss. München (1980) z. Z. noch unveröffentlicht
129. VAERMAN, J. P.
Comperative immunochemistry of IgA.
Res. Immunochem. Immunobiol. 3 (1973) 91 - 183
130. VERDER, E. & EVANS, J.
Aproposed antigenetic Schema for differenta-
tion of Strains of Ps. aeruginosa.
J. Infectious Diseases 109 (1961) 183 - 193
131. VOLKHEIMER, G.
Das Phänomen der Persorption von Stärkekörnern.
Die Stärke 20 (1968) 117 - 126
132. WARNATZ, H.
Der physiologische Immunstatus
Diagnostik 9 (1977) 450 - 452
133. WIESMANN, E.
Medizinische Mikrobiologie.
3. Auflage
Thieme Verlag Stuttgart (1974)

134. YOUNG, L. S., MEYERS, R. D. & ARMSTRONG, D.
Ps. aeruginosa Vaccine in Cancer Patients.
Report of controlled prospective Trial.
Ann. Intern. Med. 79 (1973) 518 - 527
135. ZELLNER, P. R., METZGER, E. & ZWISLER, O.
Aktive Immunisation against Ps. aeruginosa
in Burns.
In Gram-negativ bacterial infections edited
by Urbaschek, R., published by Neter, E.,
Vienna and New York (1975) 499
136. ZIEGLER, E. J., DOUGLAS, H. & BRANDE, A. J.
Experimental Bacteriemia to Pseudomonas
in Agranulocytic Animals.
J. Infectious Diseases 130 (1974) 145 - 148

Die vorgelegte Arbeit wurde am Institut für CHIRURGISCHE FORSCHUNG (Direktor Professor Dr. med. Dr. h.c. W. BRENDEL) der Chirurgischen Universitätsklinik München durchgeführt. Für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Themas möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Brendel vielmals bedanken.

Die tierexperimentellen und labortechnischen Arbeiten erfolgten in den Räumlichkeiten der Bayerischen Landesimpfanstalt. Für die großzügige Überlassung des Arbeitsplatzes zur Durchführung dieser Arbeit bin ich Herrn Prof. Dr. med. H. Stickl sowie seiner Mitarbeiterin, Frl. Dr. D. van Thiel, sehr zu Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. G. Lob und Herrn Prof. Dr. med. Seifert für die freundliche Betreuung sowie für die Beratung und Unterstützung bei der Ausarbeitung und Gestaltung dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde vom Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften finanziell gefördert, wofür ich mich an dieser Stelle bedanke.

LEBENS LAUF

Am 31. 12. 1948 wurde ich, Georg Urbach, in Augsburg geboren.

Von 1955 - 1962 besuchte ich in Augsburg die Volksschule, von 1962 - 1966 die Realschule mit Abschluß der Realschulreife.

Anschließend absolvierte ich von 1966 - 1969 eine Lehre als Elektromechaniker bei der Fa. National Registrier Kassen GmbH mit Abschluß als Facharbeiter.

Von 1969 - 1972 besuchte ich das Bayernkolleg Augsburg mit Abschluß der Hochschulreife.

1972 begann ich mit dem Studium der Humanmedizin an der Universität München.

Vorphysikum 1973, Physikum 1974, I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 1975, II. Abschnitt 1977, III. Abschnitt 1978.

Praktisches Jahr 1977/78, Innere Medizin - Chirurgie - Orthopädie.

Im November 1978 erhielt ich meine Approbation als Arzt.

Seit 1. Dezember 1978 bin ich beim KZV Augsburg,

II. Chirurgische Klinik, Chefarzt Prof. Dr. med. F. Baumgartl, als Assistenzarzt tätig.

Seit November 1978 bin ich mit der Ärztin Petra Urbach, geb. Graber, verheiratet.

